



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**APORTE ANALÍTICO AL CONOCIMIENTO DEL
COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO
DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO Y SU APLICACIÓN
A MUESTRAS NATURALES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

LEOBARDO GARCIA FLORES



CDMX.

AÑO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Eugenio Octavio Reyes Salas

VOCAL: **Profesor:** Francisco Rojo Callejas

SECRETARIO: **Profesor:** Silvia Patricia Zafra Ramírez

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Gustavo Adolfo Zelada Guillen

2° SUPLENTE: **Profesor:** René González Albarrán

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DEP_g.

LABORATORIO 114. SÓTANO DEL EDIFICIO B.

ASESOR DEL TEMA: Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas _____

SUPERVISOR TÉCNICO: M. en C. Edgar Islas Ortiz _____

SUSTENTANTE: Leobardo García Flores _____

ÍNDICE

CONTENIDO	Página
Lista de abreviaturas	iv
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>2. ANTECEDENTES</u>	
2.1 El romero	2
2.2 Composición química del romero	5
2.3 Importancia económica mundial de los aceites esenciales	6
2.4 Ácido rosmarínico	8
2.4.1 Obtención	9
2.4.2 Biosíntesis	10
2.4.3 Distribución de ácido rosmarínico en el reino vegetal	11
2.5 Marco teórico	13
2.5.1 Polarografía	14
2.5.2 Modalidades polarográficas	19
2.5.3 Estudio matemático de las ondas polarográficas	20
<u>3. OBJETIVOS</u>	
3.1 Objetivo general	22
3.2 Objetivos particulares	22
<u>4. METODOLOGÍA</u>	23
4.1 Equipo	24
4.2 Reactivos	25
4.3 Patrón de ácido rosmarínico	25
4.4 Pruebas de solubilidad	26

4.5 Valoración potenciométrica de la disolución patrón	26
4.6 Pruebas cualitativas con cationes metálicos	26
4.7 Estudio electroquímico fundamental del ácido rosmarínico	27
4.8 Valoraciones complejométricas	27
4.9 Cuantificación del ácido rosmarínico en extractos comerciales	28
4.9.1 Determinación de contenido de ácido rosmarínico en romero:	
Extracción Soxhlet	30
<u>5. RESULTADOS Y ANÁLISIS</u>	
5.1 Pruebas de solubilidad	32
5.2 Preparación de la disolución de trabajo	32
5.3 Valoración potenciométrica de la disolución patrón	33
5.4 Pruebas cualitativas con cationes metálicos	37
5.5 Estudio electroquímico del ácido rosmarínico	41
5.5.1 Dominio de electroactividad	41
5.5.2 Polarograma del ácido rosmarínico	42
5.6 Valoraciones complejométricas	51
5.6.1 Complejos de ácido rosmarínico con Cu(II)	52
5.6.2 Complejos de ácido rosmarínico con Hg(II)	56
5.7 Cuantificación del ácido rosmarínico en extractos naturales	60
5.7.1 Destilado de romero marca Naturland	61
5.7.2 Destilado de romero marca Attar	63
5.7.3 Aceite de romero marca WALA	65
5.7.4 Aceite de romero marca WELEDA	67
5.7.5 Extracción Soxhlet	69
<u>6. CONCLUSIONES</u>	71
<u>7. PERSPECTIVAS</u>	73
<u>8. BIBLIOGRAFÍA</u>	74

9. ANEXOS

9.1 Estudio logarítmico de las curvas i/E para la obtención del potencial de media onda ($E_{1/2}$)	79
9.2 Gráfico de Tafel	80
9.3 Determinación del Límite de detección y linealidad del método	83
9.4 Determinación de las constantes de formación de complejos	86
9.5 Construcción de los diagramas de abundancia relativa de especies	90
9.6 Estimación de la incertidumbre asociada al análisis	93

LISTA DE ABREVIATURAS

RA	Ácido rosmarínico (Rosmarinic acid)
$E_{1/2}$	Potencial de media onda
E_p	Potencial de pico
i_d	Corriente límite de difusión convectiva
i_p	Corriente de pico
i_{exp}	Corriente experimental
i_{cal}	Corriente calculada
R.A.	Reactivo Analítico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (Food and Agriculture Organization)
EPA	Agencia de protección ambiental (U.S. Environmental Protection Agency)
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (Food and Drugs Administration)
PAL	Fenilalanina amoniaco-liasa
CAH	Ácido cinámico 4-hidroxilasa
4CL	Hidroxicinamato:CoA ligasa
TAT	Tirosina aminotransferasa
HPPR	Hidroxifenilpiruvato reductasa
HPPD	Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa
RAS	Hidroxicinaoil-CoA:hidroxifenil-lactato hidroxicinaoil transferasa
3-H	Hidroxicinaoil-hidroxifenil-lactato 3-hidrilasa
3'-H	Hidroxicinaoil-hidroxifenil-lactato 3'-hidrilasa
LDD	Límite de detección
LDC	Límite de cuantificación

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, mi *alma mater*.

Al Dr. Octavio Reyes, por la confianza, por el apoyo, las enseñanzas, por enseñarme que la base es el trabajo y la constancia, por inyectar de ilusión al proyecto, por los conocimientos compartidos, que fueron fundamentales para desarrollar mi potencial como científico, por ser una figura de superación y lucha por mis objetivos, por su comprensión y su consejo durante mi estancia en su laboratorio.

A mis padres, por hacer el esfuerzo de brindarme un techo y un plato lleno en mi mesa día a día, por ser la base de mis valores y principios, por su apoyo en las decisiones que he tomado durante mi vida. A mi padre por enseñarme que las cosas se ganan y a mi madre por la valentía ante la adversidad que me ha demostrado e inculcado, ahora que lo terminé se lo dedico porque es suyo.

A mis hermanos, Juan Carlos, Diana, Alejandra y Guadalupe, por su apoyo y sus consejos, por lo buenos momentos, que me han servido como inspiración y motivado para seguir superándome, pero en especial por su actitud frente a los malos ratos, que me enseñaron que la familia es lo más importante.

A mi padrino, Víctor Manuel Córdoba, por contribuir a la felicidad en mi infancia y por los consejos brindados.

A Ivan Zárate Cuautle, por ser parte de mi familia y un buen amigo.

A los miembros del jurado, Silvia Patricia Zafra Ramírez y Francisco Rojo Callejas, gracias por su tiempo y sus comentarios en la revisión, que han contribuido a mejorar la calidad de este escrito.

A mis compañeros de carrera, que más que compañeros fueron grandes amigos, a Juan Pablo Capultitla y Mario Ernesto Rodríguez, gracias por todas las experiencias compartidas.

A mis colegas del laboratorio 114, por los buenos momentos y porque me han enseñado que de todos se puede aprender; agradecimiento en especial a Edgar Islas y Gerardo Reyes por transmitir sus conocimientos y por todo el apoyo recibido de su parte.

A Elías Albiter, por su apoyo, su ánimo, su motivación y por compartirme su filosofía de vida.

A la bióloga Ariadna Alva Muri, por proporcionar unos de los destilados analizados en este trabajo.

1. INTRODUCCIÓN

A través del tiempo, con el desarrollo de la ciencia y la implementación de la tecnología, el ser humano ha sido capaz de desarrollar nuevos métodos y procesos en su búsqueda de nuevas sustancias, ya sea por medio de una síntesis, la cual consiste en la producción de un compuesto a partir de precursores más sencillos o por medio de una extracción, que se basa en el aprovechamiento de productos naturales que contienen un compuesto activo dentro de una matriz compleja. Las plantas han sido utilizadas durante miles de años en muchas partes del mundo por sus propiedades nutritivas y medicinales; aunque su empleo con fines terapéuticos estuvo asociado durante muchos años a ritos religiosos, en la actualidad, existen una gran variedad de estudios que permiten conocer sus propiedades funcionales, medicinales y toxicológicas y con ello asociar dichos efectos a un compuesto o una serie de compuestos dentro de la planta, para sustituir a otras sustancias o mejorar sus propiedades. Los productos naturales poseen un elevado contenido en principios activos que les confieren diversas características químicas, bioquímicas y organolépticas, es por lo que hoy en día las plantas con acción medicinal han adquirido gran importancia en varias regiones del mundo y son utilizadas en tratamientos con fines terapéuticos (plantas medicinales), aromáticos (plantas aromáticas o esencias) y gastronómicos (plantas empleadas como condimentos). Un ejemplo de ello es el romero (*Rosmarinus officinalis* L.), planta rica en principios activos y con acción sobre casi todos los órganos del cuerpo humano; al tener un alto contenido en aceites esenciales, cuyos ingredientes activos son flavonoides, ácidos fenólicos y principios amargos, genera acción tónica, alivia dolores musculares y estimula el sistema nervioso, circulatorio y corazón ^[1]. Uno de los compuestos más importantes dentro del romero es el ácido rosmarínico debido a su elevada capacidad como antioxidante; en este trabajo se presenta como alternativa de control de calidad de extractos de romero, un método polarográfico que permitirá identificar y cuantificar este ácido, de forma sencilla, rápida y confiable.

2. ANTECEDENTES

2.1 El Romero

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) llamado así comúnmente, es una planta de origen mediterráneo que ha tenido una gran trascendencia en el desarrollo cultural de la humanidad; diversas civilizaciones desde la antigüedad han utilizado esta planta debido a sus propiedades mágicas o milagrosas, llegando a tener un importante valor simbólico y ceremonial [2]. Los egipcios, los griegos y los romanos consideraban al romero como una planta sagrada, simbolizando el amor y la muerte, apareciendo desde entonces en bodas como signo de fidelidad y promesa del recuerdo en funerales. En la Edad Media era utilizado para la fumigación y la protección frente a las plagas; en Francia se utilizó como bactericida en los hospitales públicos incinerando una mezcla de romero y enebro; formó parte de la botánica griega, donde se utilizaba para favorecer la memoria e incluso como amuleto para contrarrestar el mal de ojo [3].

Además de su relación mística con el hombre, el romero sustenta toda una industria químico-farmacéutica [4, 5]. Su importancia en la medicina tradicional es reconocida mundialmente, así como su actividad farmacológica, siendo aprovechadas sus propiedades en la industria cosmética [6, 7].

En la actualidad, el romero ha generado una gran cantidad de investigaciones y estudios debido a sus propiedades químicas y sus posibles aplicaciones medicinales e industriales, principalmente por su elevado contenido de ácidos cafeico y rosmarínico [8]. Al igual que otras especies de géneros europeos como el toronjil (*Melissa officinalis*), la salvia (*Salvia officinalis*) y la lavanda (*Lavandula*), el romero fue introducido a México durante la época colonial [9]. El romero forma parte de la herbolaria mexicana y es una de las plantas medicinales con mayor difusión y uso en el país; figura en el cuadro básico de recursos herbolarios en el grupo de plantas con propiedades broncodilatadoras y antimicrobianas, se emplea tanto en tratamientos de enfermedades relacionadas con el aparato digestivo, el sistema nervioso, aparato reproductivo, músculo esquelético, oído, nariz y garganta [6-9].

Generalmente, el romero se encuentra de forma silvestre en zonas rocosas y arenosas cercanas al mar, pero debido a su adaptabilidad y poca exigencia para cultivarse se reproduce con facilidad en otras zonas ^[10]. En México se cultiva y presenta gran adaptación y una amplia distribución en los Estados de Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Oaxaca, Puebla, Sonora, Tlaxcala y Veracruz ^[9, 11].

El romero pertenece a la familia Labiatae (Labiadas), es una planta arbustiva con tallos prismáticos, las hojas son estrechas, agudas y pequeñas, tienen forma de espigas de color verde brillante con márgenes revolutos y tallos leñosos y ramificados. El tamaño varía de 0.5 a 1 metro de altura, florece dos veces al año, en primavera y otoño, las flores se caracterizan por un color azul claro con pequeñas manchas violetas ^[12].



Figura 1. Planta de romero en floración (*Rosmarinus officinalis* L.).

Taxonómicamente el romero es identificado como una sola especie, aunque es posible encontrar híbridos en la naturaleza según algunas clasificaciones morfológicas ^[13].

La clasificación popular entre los productores, herbolarios y comerciantes distingue dos tipos de romero (romero macho: M y romero hembra: H), cuya distinción se hace notar en la intensidad del aroma, el color, la forma, el tamaño, sus propiedades medicinales y su actividad antibacteriana, características que se presentan en mayor grado en el romero M con respecto al romero H, y son debidas principalmente a pequeñas diferencias entre las cantidades de algunos compuestos que contienen cada una de ellas [14].



Figura 2. *Rosmarinus officinalis* L. 1. Rama Floral, 2. Flor, 3. Cáliz cerrado, 4. Pedicelo, 5. Corola, 6. Estambre con anteras, 7. Pistilo, 8. Fruto, 9. Semilla, 10. Ovario. Tomado de Missouri Botanical Gardens.

Litografía en color, Kohler's Medizinal Pflazen. Fotografiado por James Zarucchi [15].

2.2 Composición química del romero

El romero es una de las plantas medicinales con mayor relevancia en la actualidad, su composición química puede variar de acuerdo con su origen, aspectos relacionados con su crecimiento y floración como la época del año, humedad, tipo de suelo, etc. Diversos estudios han identificado alrededor de 200 componentes químicos constituyentes de los aceites esenciales [16-18]. Dentro de éstos, hay compuestos alifáticos, monoterpenos: alcoholes, cetonas, éteres, ésteres y sesquiterpenos. Los compuestos más ligeros del aceite esencial son los compuestos alifáticos como 2-metilbutanal, 3-octanol, 1-octen-3-ol, 3-octanona, cuyo contenido es menor al 0.1 %. Los compuestos monoterpenos de los aceites esenciales brindan la calidad olfativa de los mismos, su contenido varía del 20 al 75 %, entre los cuales podemos encontrar monoterpenos acíclicos: mirceno, ocimeno; monocíclicos: limoneno, α y γ terpineno, p-cimeno; bicíclicos: α y β pineno, 3-careno; alcoholes: linalool, α -terpineol, borneol; cetonas: alcanfor, verbenona; ésteres: acetato de bornilo; éteres: eucaliptol. Cerca de 30 sesquiterpenos han sido identificados en el aceite de romero, siendo los compuestos cariofileno y humuleno los más abundantes, su contenido puede variar del 2 % hasta el 8 % [19]. La mayor cantidad de los componentes con demostrada actividad biológica del romero se encuentran en las hojas, de donde se obtienen sus derivados, aceite y extracto [20]. Los ácidos fenólicos, cafeico y rosmarínico son dos de los compuestos de mayor trascendencia en el romero debido a su elevada capacidad antioxidante [21, 22]. Incluso se ha demostrado que el ácido rosmarínico es un antioxidante superior a la vitamina E, previniendo el daño causado por los radicales libres [23]. Debido al uso comercial que se hace de los derivados del romero, es evidente el creciente interés tanto por parte de los consumidores como de la propia industria en lo que a los parámetros de calidad se refiere. Los principales requisitos para producir aceites esenciales consisten en disponer del material vegetal correcto, buenos suelos, material adecuado de riego, equipo de cosecha y finalmente equipo de destilación.

Los aceites esenciales son los derivados de productos naturales con mayor demanda, obteniéndose principalmente mediante dos métodos:

- 1) Destilación con vapor de agua
- 2) Maceración

La extracción por maceración es un proceso considerado lento y costoso, ya que en ocasiones la cantidad de disolvente utilizado puede llegar hasta una proporción 20:1 en relación con la planta utilizada.

2.3 Importancia económica mundial de los aceites esenciales

Se conocen alrededor de 3,000 tipos de aceites esenciales, aunque sólo 300 tienen importancia comercial. Se puede afirmar que, a escala mundial, los 18 aceites esenciales más importantes representan casi el 50 % del valor total. Casi el 90 % del consumo mundial de aceites esenciales, se produce en 13 países, liderados por Estados Unidos y China. El mercado mundial de plantas aromáticas y medicinales aporta alrededor de 83,000 millones de dólares ^[24].

La demanda de composiciones aromáticas ha crecido en el sector agroindustrial a razón de un 10 % anual desde 1960; sus principales destinos son:

- Industria de bebidas
- Industria de lácteos
- Industria de golosinas
- Productoras de saborizantes
- Productoras de cosméticos

Recientemente los aceites esenciales han experimentado un ligero aumento frente a los productos de síntesis. A nivel mundial se producen 300 toneladas de aceite esencial de romero, siendo España, Marruecos y Túnez los países de mayor producción ^[25-27].

Según la FAO, el aceite esencial de romero ocupa el octavo lugar de producción a nivel mundial. En México, la importación de aceites esenciales ocupa el vigésimo lugar entre los productos que generan la salida de divisas, por ello la producción de romero, además de su importancia medicinal dentro de un plan nacional de salud, es un recurso viable para la industria como materia básica en la elaboración de perfumes, en medicinas alternativas y como recurso económico para los productores de plantas medicinales y aromáticas [25, 28].



Figura 3. Aceite esencial de romero.

2.4 Ácido rosmarínico

El interés que genera el ácido rosmarínico está directamente relacionado con su actividad biológica; diversos estudios demuestran sus propiedades como astringente, antiinflamatorio, antibacterial, antimutagénico y antioxidante [29]. También se ha demostrado que es un compuesto útil para la prevención de la aterosclerosis y el cáncer; es efectivo para el tratamiento del asma alérgica y reduce la hinchazón durante un ataque de alergias, siendo un antihistamínico natural eficaz [30-32]. El ácido rosmarínico es un sólido de color marrón, con olor ligeramente amargo, tiene una masa molar de 360.31 g/mol y su punto de fusión es de 171 a 175 °C; fue aislado por primera vez en 1958 por los químicos italianos M.L. Scarpati y G. Oriente a partir de la planta *Rosmarinus officinalis* Lamiaceae [33].

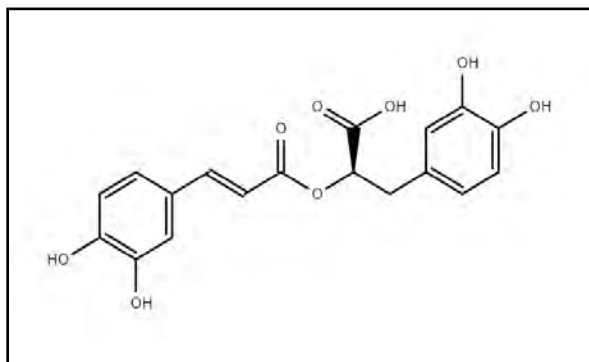


Figura 4. Estructura de ácido rosmarínico ($C_{18}H_{16}O_8$). Nombre IUPAC: Ácido (2R)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi] propanóico [34].

La presencia de este ácido en plantas medicinales, hierbas y especias es benéfica y tiene efectos positivos en la salud de las personas que las consumen [35]. Este compuesto ha sido identificado en plantas como el romero, el orégano, la salvia, la menta, la ruda, el toronjil y algunas otras [36, 37].

2.4.1 Obtención

El ácido rosmarínico es un éster del ácido cafeico y ácido 3,4-dihidroxifeniláctico; para que estos compuestos lleguen a formarse en la naturaleza, es necesaria una serie de reacciones y transformaciones que comienza con los aminoácidos L-Fenilalanina y L-Tirosina; el ácido cafeico es formado únicamente por la L-Fenilalanina y el ácido 3,4-dihidroxifeniláctico sólo por la L-Tirosina en un proceso en el que intervienen 8 enzimas [38,39]. La síntesis de este ácido ha sido reportada en una patente cuyo rendimiento global indicado es del 49 % y en la que el último paso de la síntesis incluye una esterificación de Fischer [40].

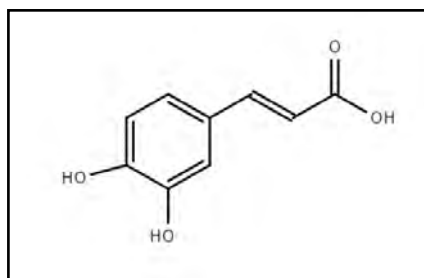


Figura 5. Estructura del ácido cafeico.

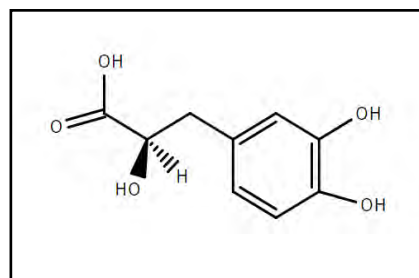


Figura 6. Estructura del ácido 3,4-dihidroxifeniláctico.

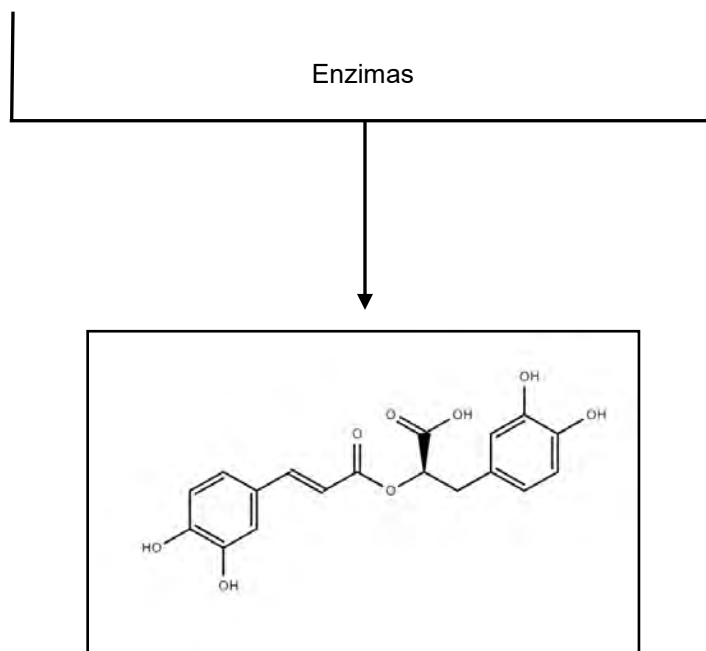


Figura 7. Estructura del ácido rosmarínico.

2.4.3 Distribución de ácido rosmarínico en el reino vegetal

La distribución de ácido rosmarínico en el reino vegetal es muy variada, se encuentra en todas las plantas de la familia *Boraginaceae*, se puede encontrar en los helechos de la familia *Blechnaceae*, en la familia *Zosteraceae*, en la familia *Apaiaceae*, dentro de la familia de las *Lamiaceae* está restringido a la subfamilia *Nepetoideae* y dentro de la clase *Dicotyledoneae* [41-43]. Esta distribución muestra que la presencia de ácido rosmarínico no puede ser considerada como un marcador quimiotaxonómico para diferenciar entre familias.

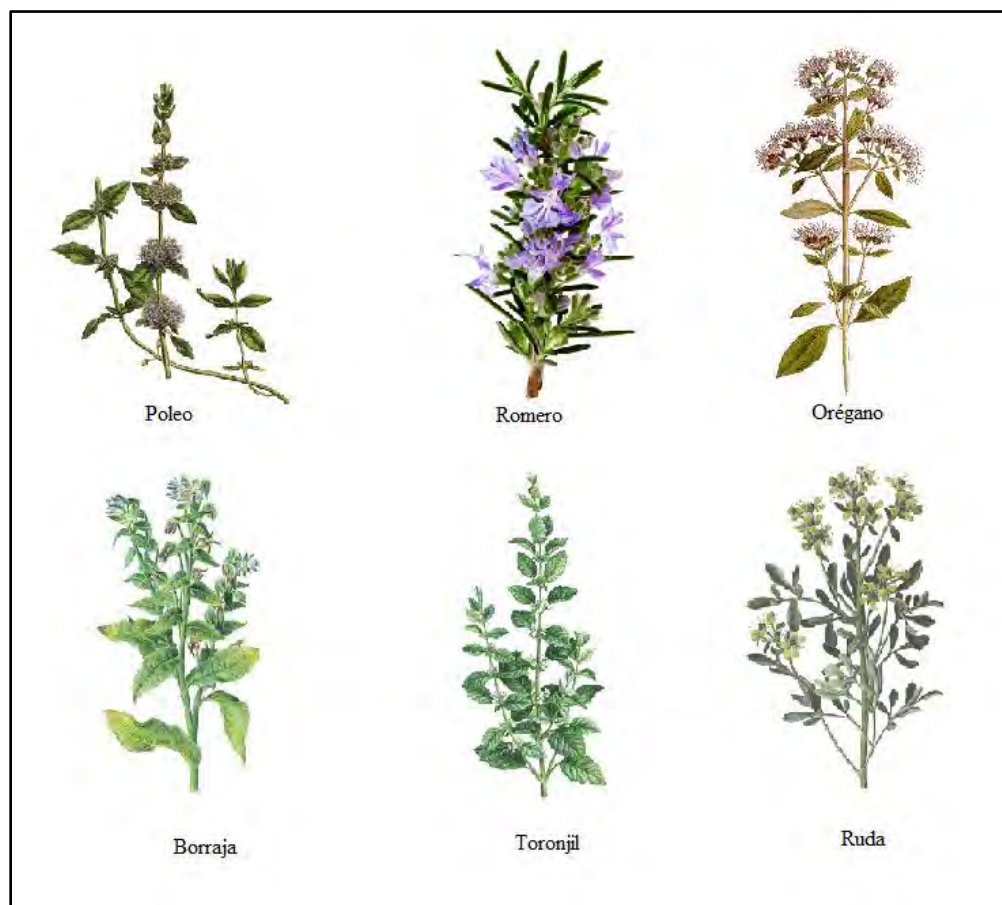


Figura 9. Algunas plantas en las que se ha identificado el ácido rosmarínico [41-43].

A pesar de que se ha demostrado la existencia de algunos derivados de ácido rosmarínico, su biosíntesis en los productos naturales es muy escasa, esto en comparación con la cantidad de ácido rosmarínico producido, los derivados más conocidos son el ácido isorínico y el ácido litospérmico, los cuales presentan propiedades similares entre ellos.

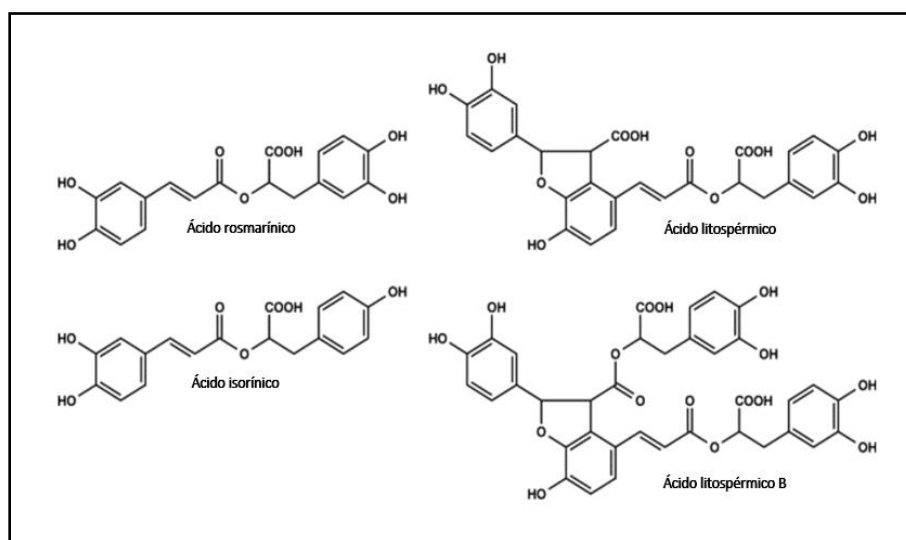


Figura 10. Estructura del ácido rosmarínico y algunos derivados [39].

En la actualidad, existen diversas investigaciones sobre los efectos biológicos del ácido rosmarínico; sin embargo, no existe un estudio que describa su estabilidad o que mencione aspectos relacionados con su reactividad; es por ello que el proyecto propone la creación de un método de análisis para su observación mediante la variación de parámetros relacionados con la condicionalidad y posteriormente la propuesta de un método que permita la cuantificación de este ácido de forma práctica y funcional.

2.5 Marco teórico

Hoy en día, se cuenta con diversas técnicas que permiten identificar y cuantificar un compuesto con base en sus propiedades; la voltamperometría es un método electroanalítico que depende de la medida de corrientes en función del potencial aplicado y se basa en el estudio de reacciones redox o de oxidación reducción. Una reacción redox es aquella en la que cambia el estado de oxidación de las especies reaccionantes porque se produce un intercambio de electrones entre los reactivos, y con ello, viene asociado un cambio de energía química. Para que exista este intercambio de energía se necesita de varios componentes, que en conjunto forman una celda electroquímica; una celda electroquímica es un dispositivo capaz de obtener energía eléctrica a partir de reacciones químicas o bien, producir reacciones químicas a través de la aplicación de energía eléctrica [44]. Existen dos tipos de celdas electroquímicas, las celdas galvánicas, en las que ocurre una reacción química de forma espontánea para producir energía eléctrica, y las celdas voltaicas, en las que es posible controlar una reacción química imponiendo un voltaje, proceso conocido como electrólisis [45]. En ambos tipos de celdas, el electrodo en que ocurre la oxidación se llama ánodo y en el que ocurre la reducción se llama cátodo.

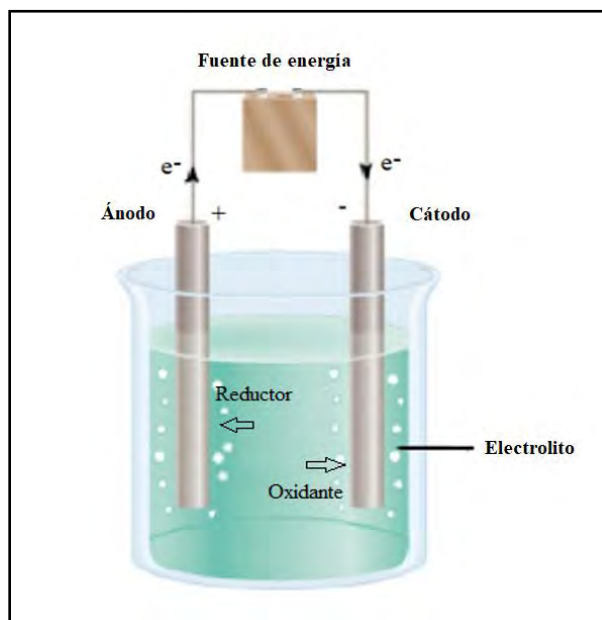


Figura 11. Celda electroquímica.

Las celdas electroquímicas son importantes en métodos electroanalíticos como la voltamperometría, en la que sustancias electroactivas participan en una reacción redox en un electrodo para producir una cantidad medible de corriente, aplicando un potencial adecuado para hacer que ocurra una reacción no espontánea o para controlar una reacción espontánea. Durante la electrólisis, el reactivo alcanza la superficie del electrodo por tres mecanismos: (1) la migración por efecto de un campo eléctrico (cuando el reactivo tiene carga); (2) la convección resultante de la agitación o vibración, y (3) la difusión como consecuencia de diferencias de concentración entre la superficie del electrodo y el seno de la disolución. En la voltamperometría se trata de minimizar el efecto de la migración mediante la introducción de un exceso de electrolito soporte inerte. Cuando la concentración de este electrolito soporte excede la del analito en un orden de 50 a 100 veces o más, la fracción de corriente de migración total transportada por el analito se acerca a cero. En consecuencia, la velocidad de migración del analito hacia el electrodo de carga opuesta se hace prácticamente independiente del potencial aplicado; así, la electrólisis se deberá a la difusión ^[46].

2.5.1 Polarografía

En las técnicas voltamperométricas se utiliza una celda compuesta de un arreglo de 3 electrodos: un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar, cuando el electrodo de trabajo es un electrodo de gota de mercurio (EGM), la técnica se denomina polarografía. La polarografía es un tipo de voltamperometría en el que se minimiza el transporte de masa por migración y convección, siendo la difusión (en régimen estacionario o cuasi estacionario) el único modo de transporte que controla la intensidad de corriente. El potencial eléctrico se mide entre el electrodo de trabajo (EGM) y un electrodo de referencia (con frecuencia es un electrodo de calomel) con un voltímetro de alta impedancia, en donde la corriente que circula se puede considerar despreciable. Por otro lado, la corriente se mide entre el electrodo de trabajo y un electrodo auxiliar inerte, generalmente un alambre de platino ^[44]. El uso del electrodo de gota de mercurio tiene ciertas ventajas, debido a que la superficie se renueva periódicamente se evita la pasividad del electrodo y que la determinación no dependa del pasado de la gota.

Las gotas de mercurio son muy reproducibles y hacen que bajo las mismas condiciones de electrolito soporte, las lecturas de corriente también lo sean, lo que permite la utilización del potencial de media onda ($E_{1/2}$) para identificar especies.

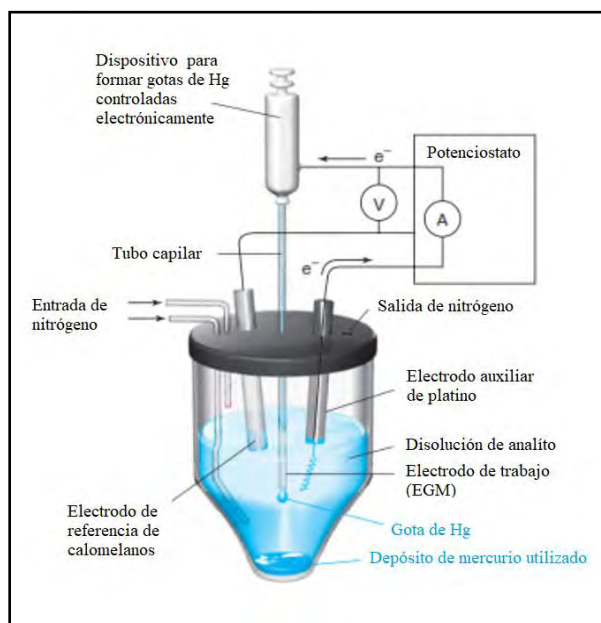
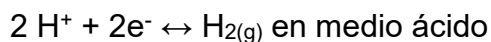


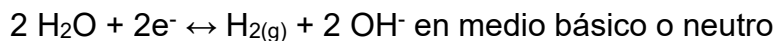
Figura 12. Celda polarográfica.

La corriente de difusión es proporcional a la concentración, permitiendo la cuantificación de las especies electroactivas en la solución. El EGM posee un elevado sobrevoltaje para la formación de hidrógeno, lo que hace posible el estudio polarográfico de iones en medio ácido, adicionalmente las determinaciones son más rápidas que en otros métodos electroanalíticos y se requiere poca cantidad de muestra. Dentro de las limitaciones que tiene la técnica cabe mencionar que la oxidación del mercurio tiene lugar en aproximadamente 0.4 V en medio acuoso vs. ECS, en solventes no acuosos la aplicación de la polarografía está también limitada por el potencial de descomposición del disolvente. Es decir, se cuenta con un intervalo de trabajo conocido como dominio de electroactividad limitado por las barreras catódica y anódica, las cuales son establecidas por el electrodo de trabajo, el electrolito soporte o el disolvente.

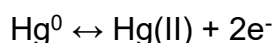
Cuando el disolvente utilizado es agua, la barrera catódica corresponde a la siguiente reacción:



ó



La barrera anódica está limitada por la oxidación del mercurio como se muestra en la siguiente reacción:



Por convención, las reacciones de oxidación tienen un valor de intensidad de corriente positiva (+) y las reacciones de reducción un valor negativo (-). Por lo tanto, las curvas intensidad-potencial de los procesos de oxidación aparecerán en la parte superior del diagrama, mientras que las curvas correspondientes a los procesos de reducción se podrán apreciar en la parte inferior.

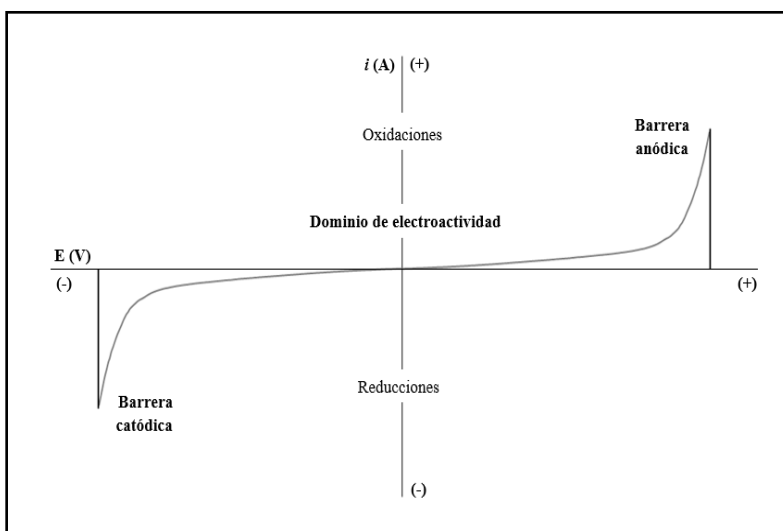


Figura 13. Polarograma típico.

Otra dificultad que presenta el análisis voltamperométrico (es decir, no aplicable exclusivamente al uso del EGM) es la interferencia del oxígeno disuelto, debido a que produce dos ondas de reducción correspondientes a 2 procesos.

1. Reducción del oxígeno a peróxido: $O_2(g) + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$ $E \approx -0,1 V.$ *
2. Reducción del peróxido de hidrógeno: $H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2 H_2O$ $E \approx -0,9 V.$ *

* Potenciales respecto al electrodo de calomel saturado.

Por este motivo, es necesario eliminar el oxígeno disuelto, burbujeando la disolución con un gas inerte de alta pureza durante varios minutos antes de comenzar el experimento ^[46]. Una vez que se ha eliminado el oxígeno se trazan las curvas de intensidad en función del potencial, curvas conocidas como polarogramas. Un polarograma, es la representación de la variación de la corriente en respuesta al potencial aplicado. Desde el punto de vista analítico, los parámetros de mayor interés en estas curvas son la intensidad de corriente y el potencial de media onda. La intensidad de corriente límite (i_d), es la variable cuantitativa y está restringida por la velocidad con la que el analito entra en contacto con la superficie del electrodo, siendo la difusión (en régimen cuasi estacionario) el único medio de transporte de masa; por ello también es conocida como corriente límite de difusión. El potencial de media onda ($E_{1/2}$), corresponde en el polarograma, al potencial en el cual la intensidad de corriente es la mitad de la corriente límite y es la variable cualitativa del método, debido a que es característico de cada analito en un determinado medio.

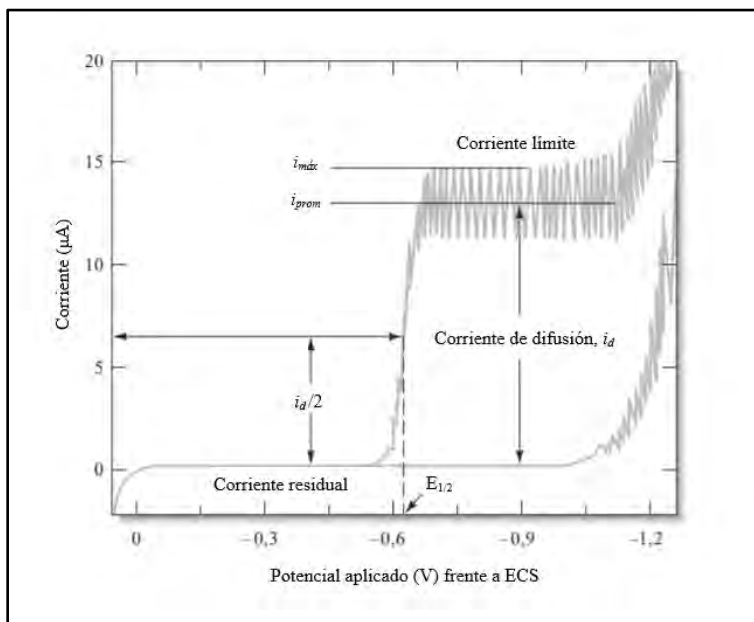


Figura 14. Curvas intensidad-potencial en polarografía clásica; en el polarograma se puede observar una señal de oxidación típica, mostrando las variables cualitativa y cuantitativa importantes para el método [46].

Cuando el único modo de transporte actuando es la difusión, se obtiene una relación directa entre la corriente medida y la concentración de la especie electroactiva. Esta relación fue desarrollada por Dionyz Ilkovic en 1934, donde consideró que el área del electrodo cambia constantemente, asumiendo que la gota es esférica todo el tiempo, aplicó las leyes de difusión (leyes de Fick) para una difusión radial hacia la superficie del electrodo, obteniendo la ecuación: $i_d = n K^D C$.

Donde K^D es la constante de difusión, n es el número de electrones intercambiados y C es la concentración del analito; de esta forma, se obtiene una relación lineal entre la concentración de la especie analizada y el valor de la corriente difusional. La no linealidad entre la intensidad de corriente y la concentración puede ser debida con frecuencia a fenómenos de adsorción al electrodo, reacciones químicas acopladas, factores cinéticos, e incluso a la evaporación del disolvente durante el burbujeo de gas para eliminar el oxígeno disuelto.

2.5.2 Modalidades polarográficas

El uso de la polarografía con fines cualitativos consiste en registrar el polarograma de la muestra en un determinado electrolito soporte y comparar el potencial de media onda o el potencial de pico con el de especies conocidas registradas en el mismo medio; comúnmente se utiliza la polarografía clásica para identificar una especie, con este método se registra la corriente como una función del voltaje aplicado con cierta rampa lineal de voltaje de corriente directa a la celda polarográfica. El voltaje aplicado puede oxidar o reducir una especie cuando comienza a alcanzarse el potencial de transformación, esto provoca que aumente la concentración de la especie transformada en la superficie del electrodo y como consecuencia la corriente también aumente. Al seguir aumentando el voltaje se llega a un punto donde el gradiente de concentración alcanza su valor máximo y permanece constante con el voltaje aplicado, esto hace que la corriente permanezca constante, debido a que ocurre la polarización completa del electrodo; la concentración de la forma inicial del analito electrolizado en la superficie del electrodo es mucho menor (casi nula) que la concentración en el seno de la disolución. Esta corriente, que se hace independiente del voltaje aplicado, se denomina corriente de difusión o corriente límite por difusión, debido a que está limitada por la velocidad de difusión de la especie electrolizable hacia el electrodo. Para procesos reversibles, el potencial de media onda es una característica de la especie electroactiva y del medio (electrolito soporte), no dependiendo de la concentración ni de las características del capilar utilizado. Para procesos irreversibles, el potencial de media onda depende de la concentración y de las características del electrodo, aunque la influencia de estos factores sobre el potencial de media onda no es lo suficientemente grande como para impedir la identificación de una especie por su $E_{1/2}$. La polarografía diferencial de impulsos utiliza pequeños impulsos superpuestos a una rampa lineal de voltaje. En esta se mide la corriente antes de la aplicación del pulso y al final de este. El polarógrafo resta la primera corriente de la segunda, y representa esta diferencia frente al potencial aplicado; al medir la corriente de esta forma se aumenta la sensibilidad del método.

Los límites de detección de las técnicas polarográficas vienen fijados normalmente por la magnitud de la corriente capacitiva, la cual es el flujo de carga que se almacena entre la interfase electrodo-disolución, mejor conocida como *doble capa*. La polarografía diferencial de impulsos presenta mayor sensibilidad que la polarografía clásica; por medio de ella se pueden medir concentraciones de hasta 10^{-8} mol/L, mientras que por la polarografía clásica se detectan concentraciones de hasta 10^{-6} mol/L. Esto se debe al aumento de la corriente faradaica combinado con una disminución en la corriente capacitiva [45]. Con fines de análisis cuantitativo, se mide la intensidad de corriente (i_d), para lo cual se utiliza la altura de pico o de onda correspondiente a cada analito y se compara con la curva de calibrado trazado para diferentes concentraciones de la especie en el mismo medio, de acuerdo con la ecuación de Ilkovic [45].

2.5.3 Estudio matemático de las ondas polarográficas

Considerando el sistema sencillo: $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$; las ondas polarográficas describen un comportamiento expresado por la ecuación de Nernst a 25 °C.

$$E = E^\circ + \frac{0.059}{n} \log \left[\frac{Ox}{Red} \right]$$

Que se convierte en:

$$E = E_{1/2} + \frac{0.059}{n} \log \left[\frac{i - i_{ox}}{i_{red} - i} \right]$$

Para la señal polarográfica. Para procesos de oxidación o anódicos, la ecuación se escribe de la forma:

$$E = E_{1/2} + \frac{0.059}{n} \log \left[\frac{i_{red} - i}{i} \right]$$

Una gráfica de potencial (E) vs. $\log [i_{red} - i/i]$ es una línea recta cuya ordenada al origen corresponde al potencial de media onda ($E_{1/2}$) y la pendiente ($m = 0.059/n$) involucra el número de electrones intercambiados (n); se relaciona con la cinética de la reacción y muestra si el proceso cumple con la ecuación de Nernst de manera ideal o no.

En caso de que se cumpla la ecuación de Nernst se considera un sistema electroquímicamente rápido. El potencial de media onda es característico de cada sistema redox en un determinado medio y en general es independiente de la concentración de la especie electroactiva. Proporciona información sobre la velocidad con la que se alcanza el equilibrio de reacción en la superficie del electrodo [45]. Para sistemas que se alejan del comportamiento nernstiano, las ondas polarográficas se pueden representar según la ecuación de Tafel:

$$\log i = \log i_0 + \frac{\alpha n F}{2.3 RT} * \eta$$

Donde η es el sobrepotencial ($\eta = E - E_{eq}$), i es la corriente, i_0 es la corriente de intercambio, que representa la corriente que se transfiere al potencial de equilibrio (E_{eq}), α es el coeficiente de transferencia de carga, n es el número de electrones intercambiados, F es la constante de Faraday, R es la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta. En esta ecuación i_0 y α representan los parámetros cinéticos, siendo mayor la velocidad de intercambio de electrones para valores mayores de i_0 y valores de α cercanos a 0.5. Una representación de potencial (E) vs. $\log |i|$, es una herramienta útil para evaluar parámetros cinéticos. Se pueden identificar dos ramas, una anódica con una pendiente igual a $\alpha n F / 2.3 RT$ y una catódica con una pendiente igual a $-\alpha n F / 2.3 RT$. Ambos segmentos pueden extrapolarse con el fin de calcular i_0 [46].

En la dinastía faraónica se colocaban ramas de romero sobre las tumbas con la intención de perfumar el viaje hacia el país de los muertos.



Papiro de Hunefer 1275 a.C. (The British Museum Press). Juicio de **Osiris**, el difunto es llevado ante Osiris, donde Anubis pesa su corazón en una balanza contra una pluma que representa a Maât, la diosa de la verdad y la justicia, Tot anota el resultado, si su corazón es tan ligero como la pluma, se le permite pasar a la otra vida. Si no es así, es devorado por la criatura Ammyt.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Conocer el comportamiento del ácido rosmarínico en distintas condiciones mediante su estudio analítico y electroquímico fundamental, con el fin de proponer un método eficaz para su cuantificación en extractos naturales.

3.2 Objetivos particulares

- 1.- Estudiar las propiedades ácido-base del ácido rosmarínico mediante valoraciones potenciométricas.
- 2.- Estudiar el comportamiento óxido-reducción del ácido rosmarínico mediante barridos de potencial con un electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo.
- 3.- Observar la formación de complejos mediante la adición de distintos cationes metálicos y realizar su valoración complejométrica correspondiente.
- 4.- Utilizar la información obtenida en el estudio electroquímico para realizar la cuantificación del ácido rosmarínico en muestras naturales.

4. METODOLOGÍA

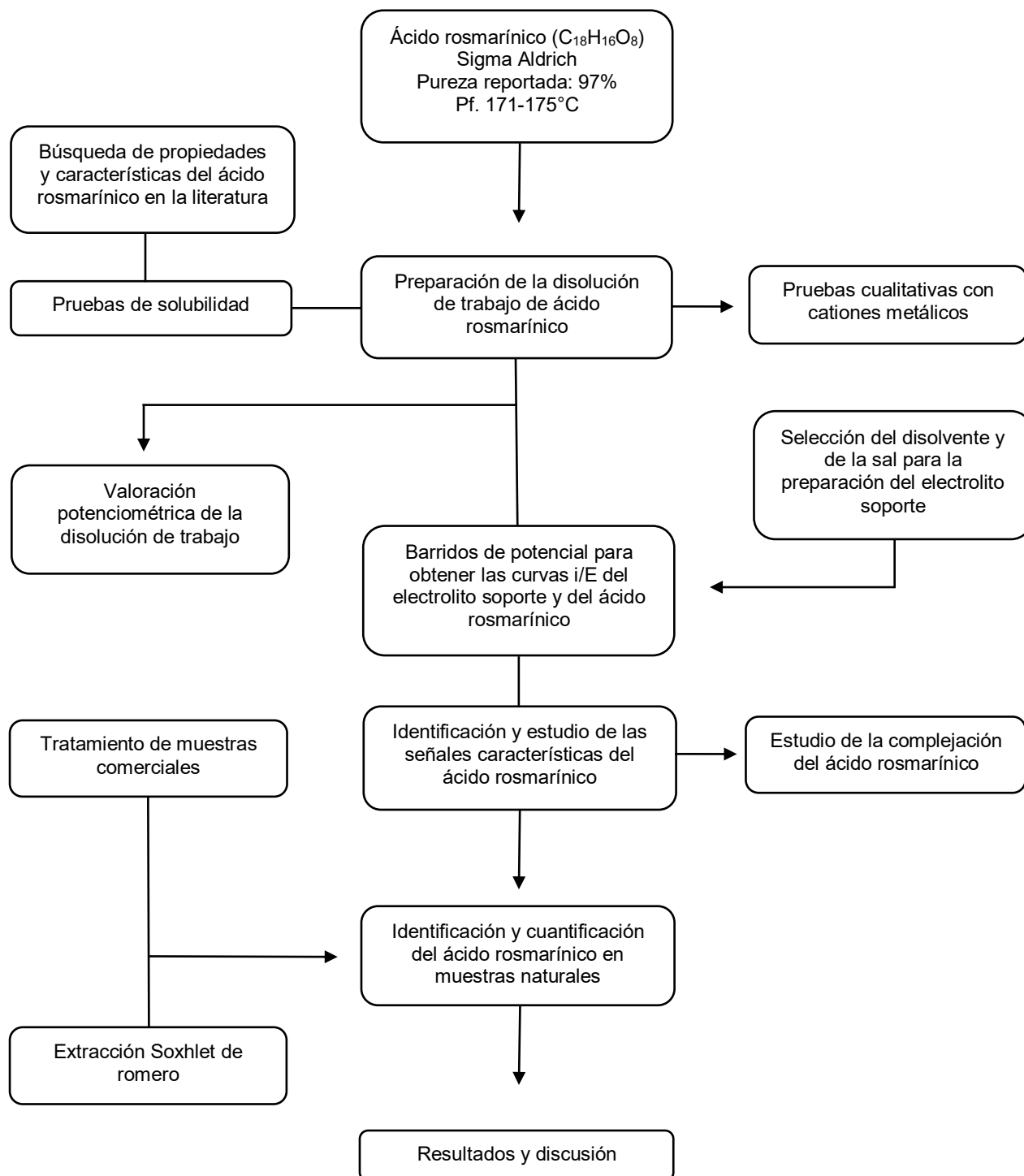


Figura 15. Metodología.

4.1 Equipo

El laboratorio cuenta con el equipo y material necesario para realizar todos los análisis mencionados en la metodología, desde el material de uso común, como material volumétrico, material graduado, micropipetas, vasos de precipitados, buretas, tubos de ensayo, naves para pesar, etcétera, hasta equipo electrónico; entre los más importantes a mencionar son:

- Balanza analítica Mettler AE240.
- 827 pHmetro lab marca Metrohm fabricado en Suiza, medidor de pH, voltaje y temperatura.
- Polarógrafo modelo 797 VA Computrace marca Metrohm que funciona con el software 797 VA Computrace Software 1.2 y se encuentra adaptado a un electrodo de gota de mercurio (EGM), un electrodo de alambre de platino como electrodo auxiliar y un electrodo de referencia: $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{ac}} 3 \text{ mol/L}$.
- Equipo de extracción Soxhlet para extracción sólido-líquido.

4.2 Reactivos

Reactivo	Pureza	Marca comercial
Ftalato ácido de potasio	99.8 %	Aldrich
Hidróxido de sodio	99.3 %	J.T. Baker
Ácido Rosmarínico	97 %	Aldrich
Ácido perclórico	70 %	Mallinckrodt
Hidróxido de litio	98 %	Merck
Cobre electrolítico	R.A.	-----
Ácido nítrico	65 %	Merck
Sulfato de cobre	99 %	J. T. Baker
Nitrato de mercurio	99 %	Merck
Etanol absoluto	-----	Analytyca
Nitrógeno	99.998 %	Praxair

Tabla 1. Reactivos utilizados.

4.3 Patrón de ácido rosmarínico

El estudio analítico se realizó con el compuesto puro, con el objetivo de conocer su comportamiento y elaborar un patrón secundario; posteriormente se utilizaron muestras comerciales de distintas marcas y un extracto de romero para identificar y cuantificar el ácido rosmarínico en ellas.

- Ácido Rosmarínico marca SIGMA-ALDRICH
- Polvo marrón
- Olor ligeramente amargo
- Punto de fusión: 171-175°C
- PM: 360.31 g/mol

4.4 Pruebas de solubilidad

Con la finalidad de encontrar un medio en el cual el ácido rosmarínico sea completamente soluble y además permita realizar el estudio electroquímico, se realizaron pruebas de solubilidad del ácido rosmarínico en diferentes disolventes. Para ello, se colocaron en diferentes tubos de ensayo 2 mL de cada uno de los disolventes a probar, que fueron: agua desionizada, mezclas de agua-etanol (proporciones 70:30, 50:50, 30:70 y 90:10 respectivamente), etanol absoluto, hexano y DMSO. En cada tubo se colocaron 10 mg aproximadamente de ácido rosmarínico y se agitó vigorosamente, se anotaron todas las observaciones. Una vez realizadas las pruebas de solubilidad y de haber seleccionado el disolvente para trabajar de acuerdo con los resultados, se preparó una disolución de trabajo de concentración cercana a 0.01 mol/L.

4.5 Valoración potenciométrica de la disolución patrón

La valoración de la disolución de ácido rosmarínico se realizó con NaOH previamente estandarizado con ftalato ácido de potasio; se realizó la titulación de diferentes alícuotas de la disolución de trabajo; la concentración del ácido rosmarínico fue calculada utilizando el método de la primera derivada.

4.6 Pruebas cualitativas con cationes metálicos

Estas pruebas fueron realizadas a la gota, se tomaron alícuotas de 50.0 μL de la disolución de ácido rosmarínico preparada con una concentración de alrededor de 0.01 mol/L y se colocaron en diferentes celdas de una lámina de porcelana, se agregaron 20.0 μL de distintos cationes metálicos en cada celda; se anotaron las observaciones. Después de algunos minutos se agregaron 20.0 μL más de catión a cada celda correspondiente; este paso se repitió en dos ocasiones. La concentración de la disolución de catión fue en cada caso similar a la concentración de nuestra disolución de trabajo, es decir, aproximadamente de 0.01 mol/L.

4.7 Estudio electroquímico fundamental del ácido rosmarínico

El estudio electroquímico del ácido rosmarínico se realizó por medio de técnicas polarográficas. Para detectar las señales del compuesto se trazaron curvas intensidad-potencial (i/E) por polarografía clásica y polarografía diferencial de impulsos. Como electrolito soporte se utilizó una disolución de LiClO_4 0.5 mol/L en agua. El disolvente utilizado fue elegido con base en los resultados de las pruebas de solubilidad del ácido rosmarínico, mientras que la sal fue seleccionada de acuerdo con los datos encontrados en la literatura, para tener un intervalo de potencial amplio. Como primer paso se trazó la curva i/E del electrolito soporte, esta curva se conoce como corriente residual; con ella se determinó el dominio de electroactividad. La metodología de trabajo consistió en colocar 20.0 mL de electrolito soporte en la celda electroquímica y burbujear nitrógeno durante 10 minutos para eliminar el oxígeno disuelto; a continuación, se midió la corriente residual. Posteriormente se realizaron adiciones de la disolución de ácido rosmarínico. Luego de cada adición se registró la correspondiente curva i/E , bajo las siguientes condiciones: velocidad de barrido de 6 mV/s, intervalo de trabajo de -2.0 a 0.5 V, en el caso de polarografía diferencial de impulsos se utiliza una amplitud de impulso de 50 mV y duración del impulso de 40 ms.

4.8 Valoraciones complejométricas

Las valoraciones complejométricas se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones que el estudio fundamental, colocando en la celda electroquímica 20.0 mL de electrolito soporte, burbujeadando nitrógeno por 10 minutos y registrando su correspondiente corriente residual; a continuación, se realizaron varias adiciones de la disolución patrón de ácido rosmarínico y se trazaron las curvas i/E de cada adición; posteriormente se hicieron adiciones de una disolución de Cu(II) 0.0073 mol/L en agua, o de Hg(II) 0.0101 mol/L en agua según el caso; las adiciones fueron realizadas con el objetivo de obtener diferentes proporciones para la relación molar catión/ácido rosmarínico durante la valoración.

Después de cada adición de catión se burbujeó nitrógeno por 30 segundos más para eliminar el oxígeno disuelto que haya podido ser agregado y se registró la respectiva curva de i/E utilizando la técnica de polarografía diferencial de impulsos. Es necesario mencionar que las disoluciones de catión fueron estandarizadas previamente en el mismo medio de trabajo.

4.9 Cuantificación de ácido rosmarínico en extractos naturales

Para la determinación del ácido rosmarínico en los productos comerciales, se contó con dos destilados de romero y con dos aceites de romero; se colocaron 20.0 mL de LiClO_4 0.5 mol/L en agua, se burbujeó nitrógeno por 10 minutos para eliminar el oxígeno disuelto y se trazaron las curvas de i/E correspondientes en polarografía clásica y polarografía diferencial de impulsos del electrolito soporte. Para la cuantificación del compuesto en los destilados de romero se tomaron alícuotas de 5.0 μL y 20.0 μL del producto con ayuda de una micropipeta; según los fabricantes, el destilado de romero es obtenido por medio de destilación por arrastre de vapor, por lo que primero se realizó una prueba de solubilidad del producto en el electrolito soporte. En cada adición se burbujeó nitrógeno durante 1 minuto y se trazó la respectiva curva i/E utilizando la técnica polarografía diferencial de impulsos; al terminar las adiciones de la muestra comercial, se realizaron adiciones de 10.0 μL y 20.0 μL de la disolución patrón de ácido rosmarínico, se burbujeó nitrógeno por 30 segundos entre cada adición y se trazó la curva de i/E de cada adición con la técnica diferencial de impulsos. A diferencia de los destilados, los aceites de romero necesitaron de un tratamiento para extraer el ácido rosmarínico disuelto; esto se determinó haciendo una prueba de solubilidad de la misma forma que con los destilados; los fabricantes indican que el producto contiene 10 % de extracto de romero. Primero, se realizó una extracción líquido-líquido utilizando como disolvente etanol absoluto; se tomó una alícuota de 3.0 mL de aceite de romero y se colocó en un tubo de ensayo, se adicionó 1.0 mL de etanol absoluto y se agitó vigorosamente, se esperó 24 horas para que se separaran las fases por completo.

Una vez separadas las fases, se tomó la fase alcohólica y se colocó en un matraz volumétrico de 5.0 mL; al tubo de ensayo se le agregó 1.0 mL más de etanol, se agitó de nuevo y se esperó a que se separaran las fases nuevamente; este paso se repitió en varias ocasiones y en varios tubos de acuerdo con lo siguiente:

Matraz 1. Una extracción con 1.0 mL de etanol, aforado con 4.0 mL de etanol.

Matraz 2. Dos extracciones con 1.0 mL de etanol cada una, aforado con 3.0 mL de etanol.

Matraz 3. Tres extracciones con 1.0 mL de etanol cada una, aforado con 2.0 mL de etanol.

Matraz 4. Cuatro extracciones con 1.0 mL de etanol cada una, aforado con 1.0 mL de etanol.

Cada matraz fue llevado al aforo hasta un volumen de 5.0 mL con etanol absoluto y conservado en una temperatura de aproximadamente 10 °C para evitar la evaporación del disolvente. Cada uno de los matraces fue analizado en experimentos separados.

Para el análisis de cada uno de ellos, se utilizaron 20.0 mL de electrolito soporte, se burbujeó nitrógeno por 10 minutos y se trazaron las curvas de i/E correspondientes en polarografía clásica y polarografía diferencial de impulsos; se realizaron adiciones de 5.0 μL de muestra problema, en cada adición se burbujeó nitrógeno durante 1 minuto y se trazó la respectiva curva i/E utilizando como técnica la polarografía diferencial de impulsos; al terminar las adiciones de la muestra problema se realizaron adiciones de 10.0 μL de la disolución patrón de ácido rosmarínico, se burbujeó nitrógeno por 1 minuto en cada adición y se trazó la curva de i/E de cada una. Todos los experimentos fueron realizados bajo las siguientes condiciones: velocidad de barrido de 6 mV/s, intervalo de trabajo de -2.0 a 0.5 V, en el caso de polarografía diferencial de impulsos se utiliza una amplitud de impulso de 50 mV y duración del impulso del 40 ms.

4.9.1 Determinación del contenido de ácido rosmarínico en romero: extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet ha sido el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en el siglo pasado, actualmente, es la principal técnica de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción. Muchos métodos de la EPA (U.S. Environmental Protection Agency) y de la FDA (Food and Drugs Administration) utilizan esta técnica clásica como método oficial para la extracción continua de sólidos. En la determinación del contenido de ácido rosmarínico en romero se utilizó esta técnica debido a que se presentan ciertas ventajas, algunas de ellas son: la sencillez de la metodología y que no depende de la matriz, además de que la extracción se realiza con el disolvente caliente, lo que favorece la solubilidad del analito y origina que se obtengan excelentes recuperaciones.

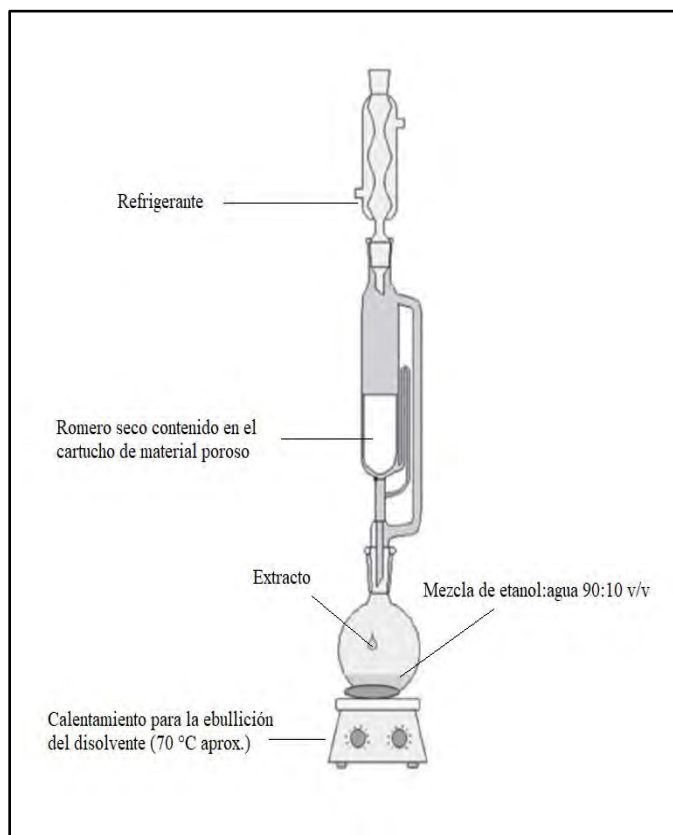


Figura 16. Sistema de extracción Soxhlet.

Para la preparación del extracto de romero se utilizaron 32.14 g de romero seco y limpio; se colocaron en el dedal situado dentro de la cámara del extractor Soxhlet. Como disolvente se utilizó una mezcla de etanol-agua con una proporción 90:10 v/v, con la finalidad de favorecer la extracción del ácido rosmarínico. La temperatura de ebullición fue de alrededor de 70 °C.

La metodología empleada para la cuantificación del compuesto fue la misma utilizada en el estudio de los extractos comerciales, se colocaron 20.0 mL de LiClO_4 0.5 mol/L en agua, se burbujeó nitrógeno por 10 minutos para eliminar el oxígeno disuelto y se trazaron las curvas de i/E correspondientes en polarografía clásica y polarografía diferencial de impulsos del electrolito soporte. Se tomaron alícuotas de 20.0, 30.0 y 50.0 μL del extracto de romero; después de las adiciones del extracto, se realizaron adiciones de 20.0 μL de disolución patrón de ácido rosmarínico, se burbujeó nitrógeno por 30 segundos entre cada adición y se trazó la curva de i/E de cada adición con la técnica diferencial de impulsos.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 Pruebas de solubilidad

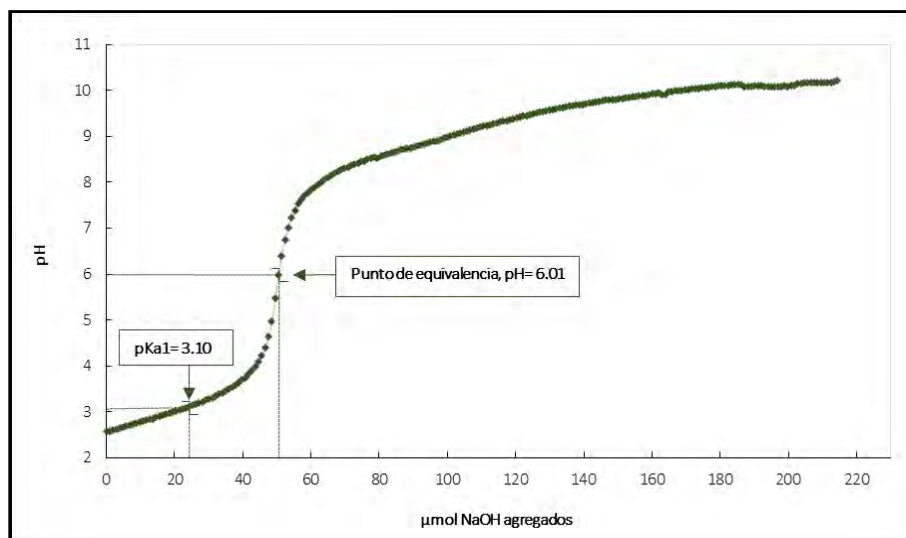
Disolvente	Observaciones
Agua	Medianamente soluble Tono ligeramente amarillo
DMSO	Soluble totalmente Tono amarillento
Metanol absoluto	Soluble totalmente Tono ligeramente amarillo
Agua-etanol (30:70, 50:50, 70:30 y 90:10)	Soluble totalmente Tono amarillento
Hexano	Insoluble Fase líquida incolora, fase sólida amarillenta
Etanol absoluto	Soluble totalmente Tono amarillento

Tabla 2. Pruebas de solubilidad del ácido rosmarínico marca Aldrich.

5.2 Preparación de la disolución de trabajo

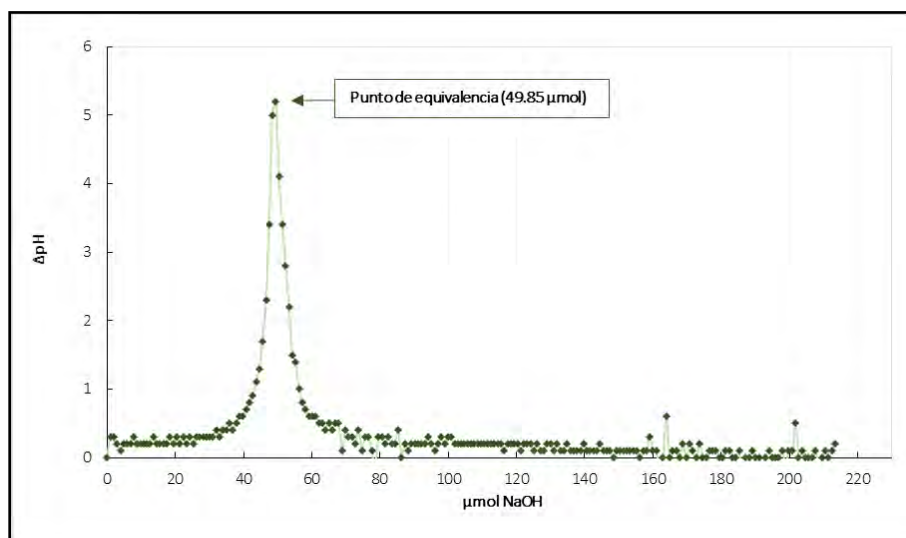
Considerando los resultados de las pruebas de solubilidad, se preparó una disolución de ácido rosmarínico en agua-alcohol; se pesaron 0.3708 g de ácido rosmarínico marca Sigma Aldrich, se añadió poco a poco etanol absoluto, agitando levemente hasta la disolución del sólido, primero se disolvió con etanol con la finalidad de utilizar la mínima cantidad de alcohol y evitar la evaporación del disolvente, el volumen total de alcohol utilizado fue de aproximadamente 10 mL; se aforó con agua desionizada hasta la marca en un matraz de 100.0 mL. Concentración teórica del ácido rosmarínico: 0.0103 mol/L en agua-etanol (90:10).

5.3 Valoración potenciométrica de la disolución patrón



Gráfica 1. Curva típica para una valoración potenciométrica de ácido rosmarínico con NaOH (0.0097 mol/L); alícuota de 5.0 mL (51.50 μmol teóricos).

Para llegar al punto de equivalencia se necesitaron 49.85 μmol de NaOH. Como la reacción ácido-base es 1:1, se tienen las mismas moles de ácido rosmarínico en la alícuota de 5.0 mL de disolución, por lo tanto, la concentración del ácido es de 0.00997 mol/L. La pureza experimental es de 96.79 %.



Gráfica 2. Primera derivada de la valoración de 5.0 mL de ácido rosmarínico con NaOH (0.0097 mol/L).

Es posible estimar el pK_{a1} mediante métodos gráficos; debido a la fuerza del ácido rosmarínico en este medio, se puede calcular el valor de pK_{a1} considerando que el pK_a es el valor de pH al cual un ácido se encuentra la mitad disociado, es decir:



Si $[A^-] = [HA]$ entonces $K_a = [H^+]$ y por lo tanto $pK_a = pH$.

$$pK_{a1} = 3.10.$$

Se realizó el cálculo de la pureza promedio con los resultados obtenidos en diferentes valoraciones, obteniendo un valor de 96.98 %, la pureza experimental es muy cercana a la pureza reportada por el fabricante, que es del 97 %.

En todas las valoraciones realizadas hasta este momento sólo fue posible analizar la primera desprotonación, la propuesta es la siguiente:

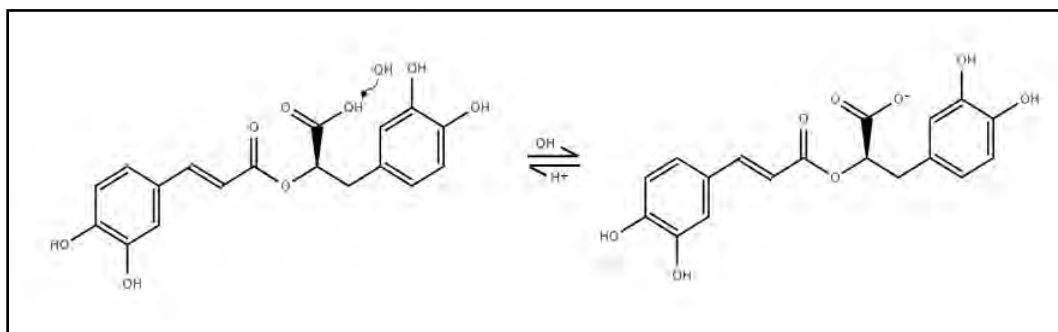
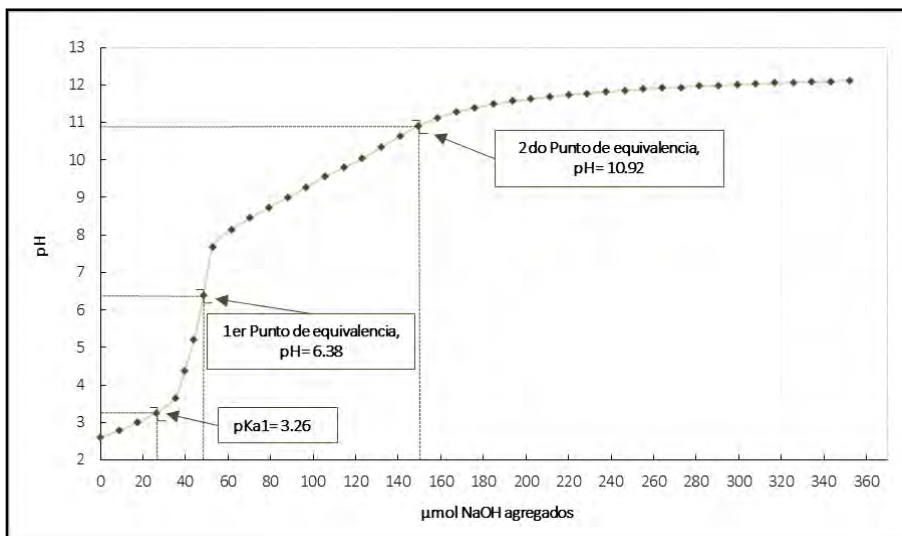
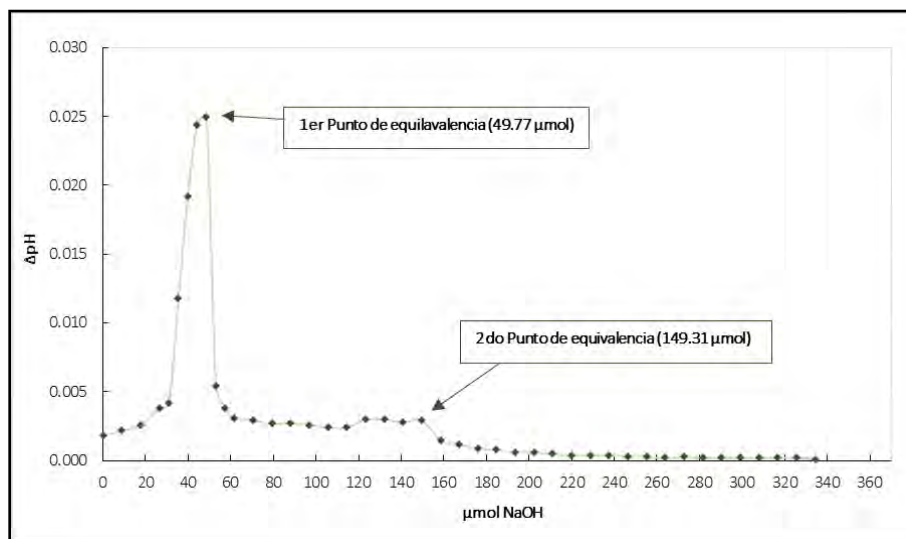


Figura 17. Equilibrio ácido-base del ácido rosmarínico, primera desprotonación.

Se realizó un experimento con la finalidad de observar una segunda desprotonación sin tener que cambiar el medio en su totalidad; se tomaron 5.0 mL de la disolución patrón de ácido rosmarínico (0.0099 mol/L), se colocaron en una celda de vidrio para su valoración, se adicionaron 2.0 mL de etanol absoluto y se tituló con NaOH (0.0097 mol/L).



Gráfica 3. Curva típica para una valoración potenciométrica de ácido rosmarínico en agua-alcohol con NaOH (0.0097 mol/L); alícuota de 5.0 mL (49.85 μmol teóricos).



Gráfica 4. Primera derivada de la valoración de 5.0 mL de ácido rosmarínico en agua-alcohol con NaOH (0.0097 mol/L).

En la gráfica 3 se puede observar el comportamiento del ácido rosmarínico al agregar NaOH; en esta ocasión se agregó etanol con la finalidad de ampliar el intervalo de titulación. En la gráfica se puede ver el primer punto de equivalencia de forma clara; también, es posible observar un ligero cambio de pendiente en una proporción 1:3 ácido-base respectivamente.

Para llegar al primer punto de equivalencia se necesitaron 49.75 μmol de NaOH, lo que indica que se tienen las mismas moles de ácido rosmarínico en 5.0 mL de disolución, por lo tanto, la concentración del ácido rosmarínico obtenida para esta valoración es de 0.00995 mol/L. El cambio de pendiente en la proporción 1:3 indica una posible desprotonación simultánea, la propuesta es la siguiente:

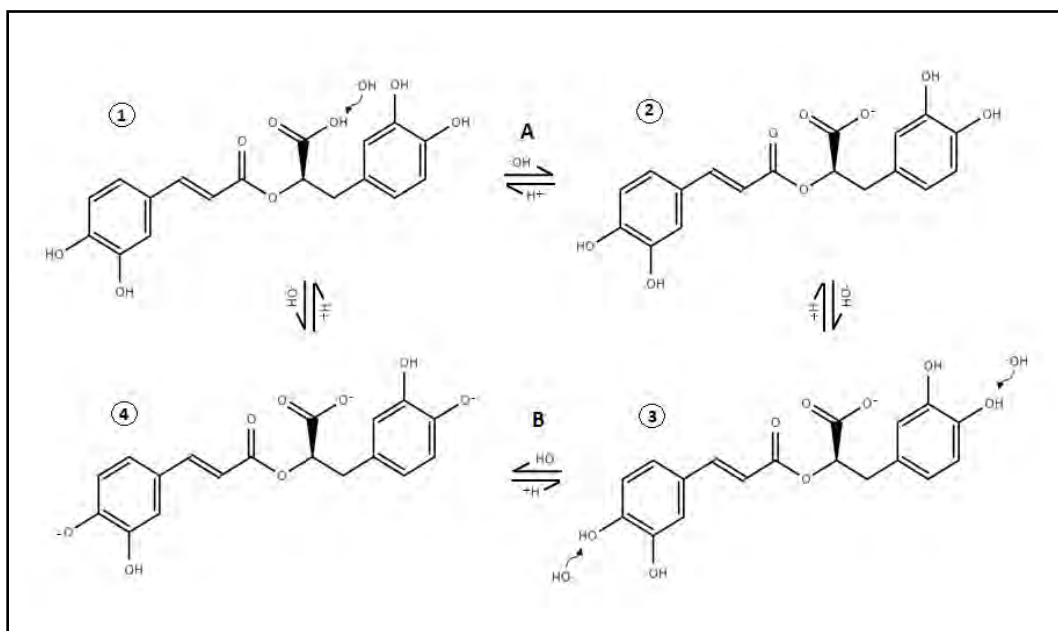


Figura 18. Equilibrio ácido-base del ácido rosmarínico, **A)** Primera desprotonación; **B)** Segunda y tercera desprotonaciones, se ha propuesto una reacción de desprotonación simultánea debido a la simetría de la molécula.

Puede considerarse que se valora primero el protón del grupo carboxílico y luego, de manera simultánea 2 protones fenólicos. La pureza experimental para esta valoración es: 96.60 %, y el valor de $\text{pK}_{\text{a}1}$ estimado gráficamente es de **3.26**. Es posible que la segunda y tercera desprotonación puedan apreciarse de mejor forma si la valoración se realiza en otro disolvente; sin embargo, no es uno de los objetivos planteados en este proyecto.

5.4 Pruebas cualitativas con cationes metálicos

Los resultados de las pruebas cualitativas fueron resumidos en la siguiente tabla; el tono de la disolución de ácido rosmarínico era ligeramente amarillento; después de cada adición se esperó alrededor de 5 a 10 minutos y después de este tiempo se realizó la siguiente adición.

Catión	Color del catión	1ra Adición	2da Adición	3ra Adición
Zn(II)	Incoloro	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
Ni(II)	Ligeramente verde	Sin cambio	Sin cambio	Sólido ligeramente café
Ag(I)	Incoloro	Tono amarillo	Tono amarillo	Líquido con tono café-rojizo
Hg(II)	Incoloro	Sin cambio	Sin cambio	Sólido café
Fe(II)	Ligeramente amarillo	Sin cambio	Sin cambio	Precipitado verde oscuro, líquido verde oscuro
Fe(III)	Ligeramente amarillo	Sin cambio	Sin cambio	Precipitado café, líquido amarillo
Pb(II)	Incoloro	Sin cambio	Tono amarillo	Precipitado café
Cd(II)	Incoloro	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
Cu(II)	Ligeramente azul	Tono amarillo	Tono amarillo	Precipitado café, líquido verde

Tabla 3. Resultados de las pruebas cualitativas de formación de complejos a pH \approx 2.5.

Los cambios en las adiciones se observaron poco a poco, los cationes que formaron precipitado con el ácido rosmarínico reaccionaron después de los 15 minutos, es decir, después de la segunda adición de catión, los resultados se pueden apreciar en la siguiente figura:

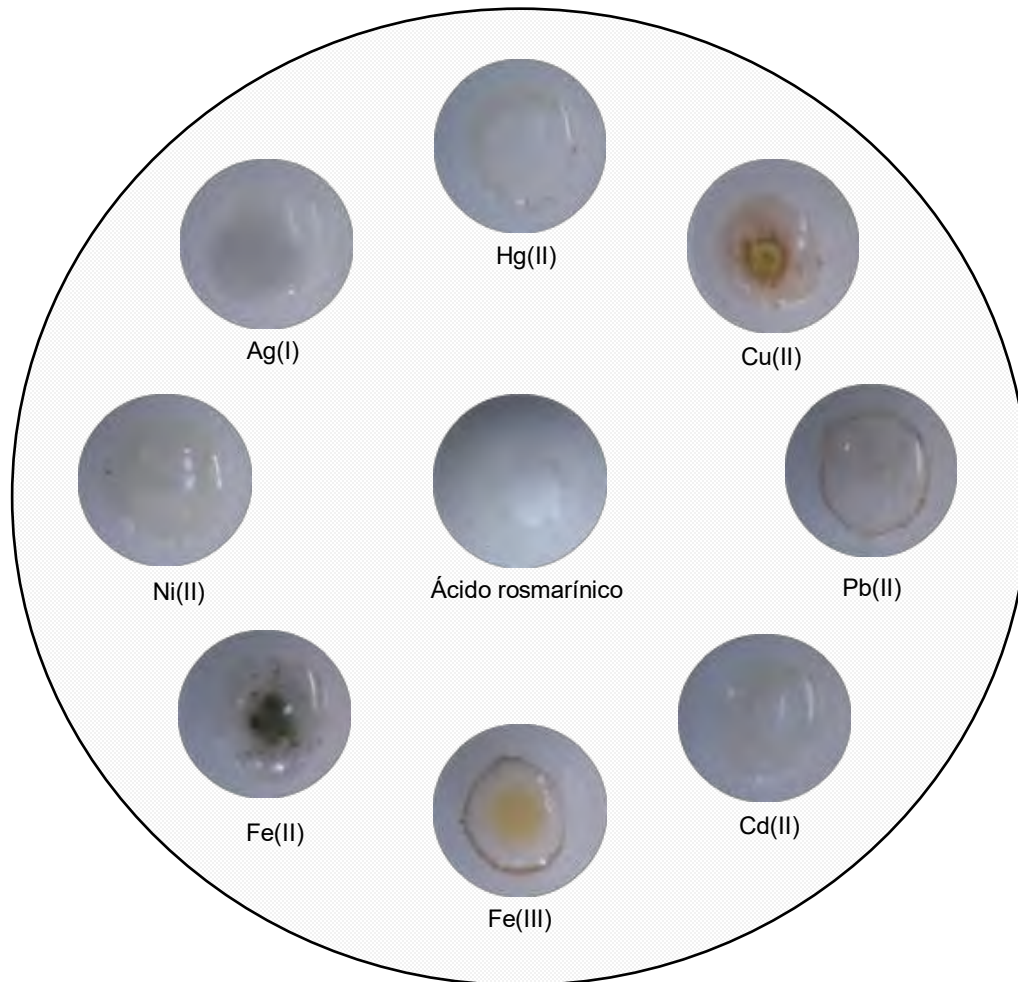


Figura 19. Resultados de las pruebas cualitativas de formación de complejos de ácido rosmarínico y distintos cationes metálicos, $\text{pH} \approx 2.5$.

Los cambios más evidentes son apreciados en las pruebas con los cationes Cu(II) , Pb(II) , Fe(II) y Fe(III) ; sin embargo, dichos cambios se observaron hasta después de 15 minutos. El experimento se repitió a un pH neutro, los resultados son los siguientes:

Catión	Color del catión	1ra Adición	2da Adición	3ra Adición
Zn(II)	Incoloro	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
Ni(II)	Ligeramente verde	Sin cambio	Sin cambio	Sólido ligeramente café
Ag(I)	Incoloro	Tono amarillo	Tono amarillo	Líquido con tono café-rojizo
Hg(II)	Incoloro	Tono café	Precipitado café	Precipitado café
Fe(II)	Ligeramente amarillo	Tono verde claro	Tono verde claro	Sólido verde claro
Fe(III)	Ligeramente amarillo	Tono amarillo	Tono amarillo	Sólido café, líquido amarillo
Pb(II)	Incoloro	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
Cd(II)	Incoloro	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
Cu(II)	Ligeramente azul	Sin cambio	Sólido naranja, líquido amarillo	Sólido naranja, líquido amarillo

Tabla 4. Resultados de las pruebas cualitativas de formación de complejos a $\text{pH} \approx 6$.

En esta ocasión los resultados fueron similares, los cambios al agregar el catión fueron más apreciables con Cu(II) , Fe(II) , y Fe(III) ; sin embargo, en este pH no hubo cambio con el catión Pb(II) y sí con Hg(II) .

En las diversas pruebas se observaron cambios en la coloración de las disoluciones, en algunos casos incluso la formación de un precipitado. Los resultados de las pruebas cualitativas muestran que el pH sí afecta la velocidad con la que se forma el complejo, aunque no de forma drástica, esto puede ser explicado considerando que a $\text{pH} \approx 6$, el ácido rosmarínico se encuentra desprotonado y es más sencilla la complejación que a un pH ácido.

Los resultados se pueden apreciar en la siguiente figura:

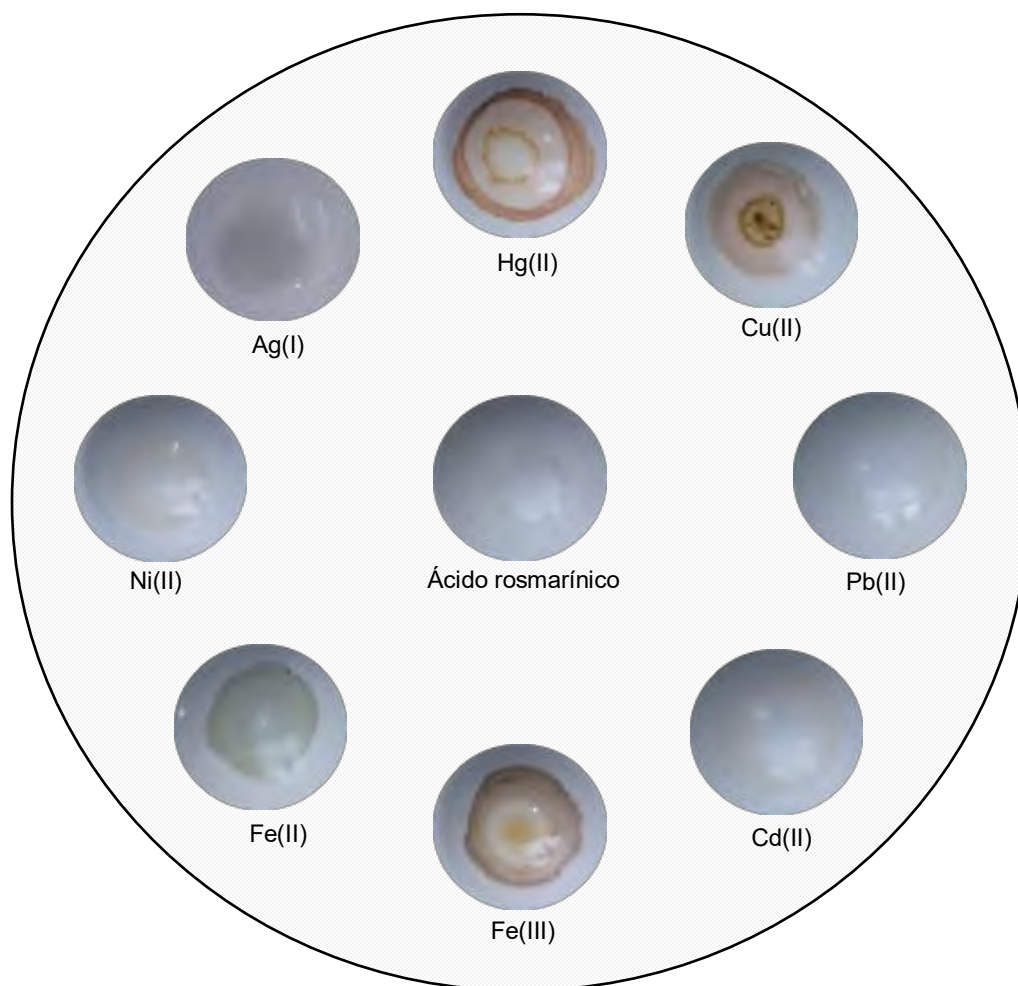


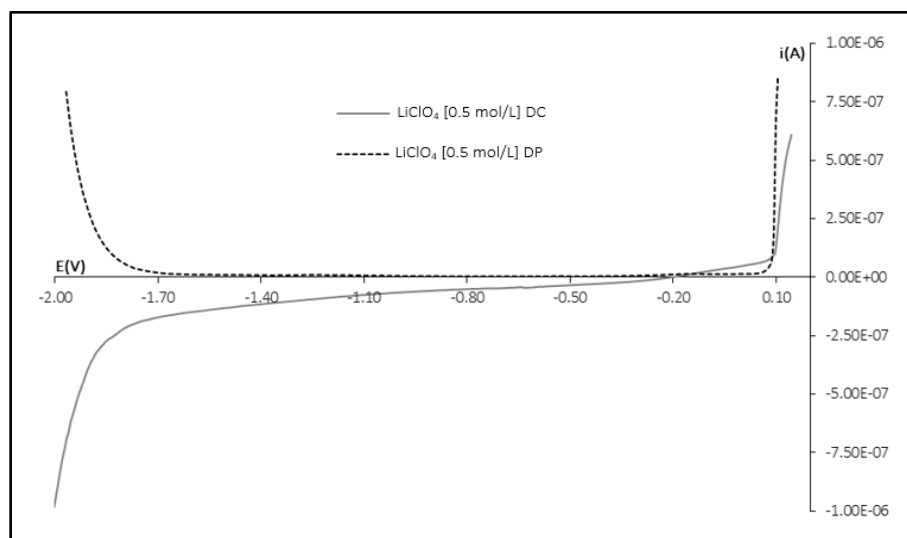
Figura 20. Resultados de las pruebas cualitativas de formación de complejos de ácido rosmarínico y distintos cationes metálicos, $\text{pH} \approx 6$.

De acuerdo con los resultados mostrados en las pruebas cualitativas se decidió utilizar los cationes Cu(II) y Hg(II) para realizar las valoraciones complejométricas. Se utilizó una disolución de Cu(II) con una concentración de 0.0073 mol/L en agua, preparada a partir de CuSO_4 y una disolución de Hg(II) con concentración de 0.0101 mol/L en agua, preparada a partir de $\text{Hg(NO}_3)_2$. Ambas disoluciones fueron estandarizadas previamente.

5.5 Estudio electroquímico del ácido rosmarínico

5.5.1. Dominio de electroactividad

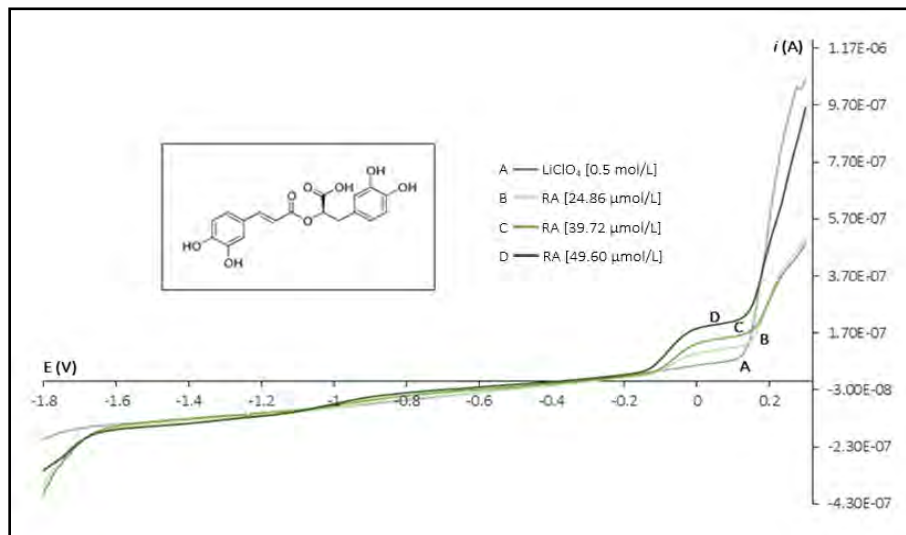
Se preparó una disolución de LiClO_4 con una concentración aproximada a 1.0 mol/L a partir de 2.462 g de hidróxido de litio (LiOH) al 98 % de pureza, ácido perclórico (HClO_4) al 70 % y agua desionizada, se realizaron los cálculos correspondientes para tener la misma cantidad de moles de HClO_4 en disolución considerando un volumen total de 100.0 mL y una concentración de 1.0 mol/L de iones Li^+ y ClO_4^- ; se necesitaron 9.0 mL de HClO_4 , llegando a un pH de 5.6. Para la determinación del dominio de electroactividad se colocaron en la celda polarográfica 10.0 mL de la disolución de LiClO_4 (1 mol/L) y 10.0 mL de agua desionizada, se burbujeó nitrógeno, se agitó por 10 minutos y se trazaron los polarogramas correspondientes con las técnicas de polarografía clásica (DC) y polarografía diferencial de impulsos (DP).



Gráfica 5. Dominio de electroactividad, corriente residual de electrolito soporte LiClO_4 (0.5 mol/L) en agua; barrido realizado de 300 a -2000 mV con las técnicas de polarografía clásica (DC) y polarografía diferencial de impulsos (DP).

5.5.2. Polarograma del ácido rosmarínico

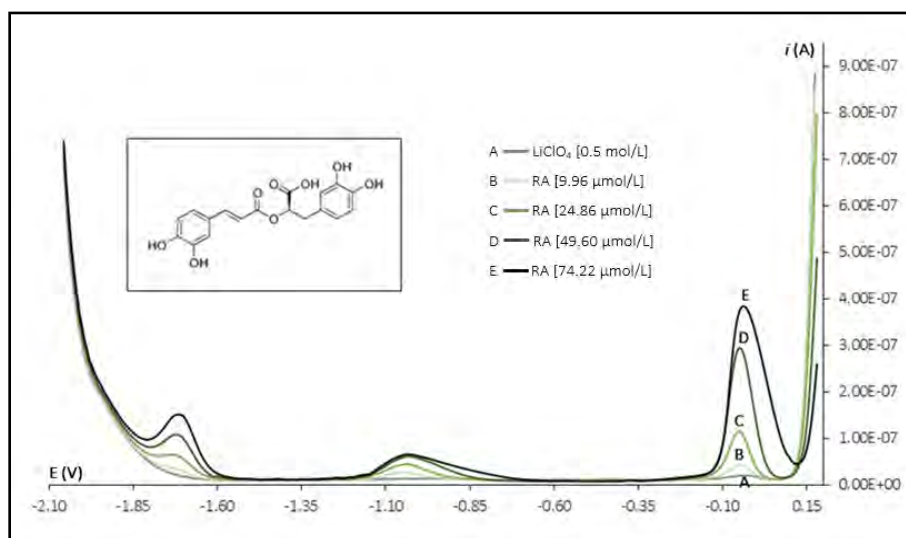
Se obtuvo el polarograma del ácido rosmarínico mediante la adición de alícuotas de 20.0, 30.0 y 50.0 μL de la disolución patrón de ácido rosmarínico 0.00997 mol/L estandarizada con NaOH, partiendo de la disolución de electrolito soporte y del polarograma correspondiente dentro del dominio de electroactividad, los barridos se realizaron comenzando del potencial de la barrera anódica hacia potenciales menores. Condiciones de operación: potencial inicial 300 mV, potencial final -2000 mV, velocidad de barrido 5 mV/s, tiempo de goteo 1.0 s. Después de cada adición de ácido rosmarínico se burbujeó con nitrógeno por 30 segundos para eliminar el oxígeno disuelto.



Gráfica 6. Curvas i/E en polarografía clásica del electrolito soporte LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua y de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico, dominio de electroactividad de 0.3 a -2.0 V.

En la gráfica 6 se observan señales en diferentes potenciales dentro del dominio de electroactividad, correspondientes al ácido rosmarínico. En los potenciales: -1.68 V, -0.98 V, y -0.33 V se observan señales de reducción, mientras que en el potencial de -0.06 V aparece una señal de oxidación. Cada una de estas señales posee intensidades de corriente diferentes que aparentemente aumentan con la concentración del ácido en disolución.

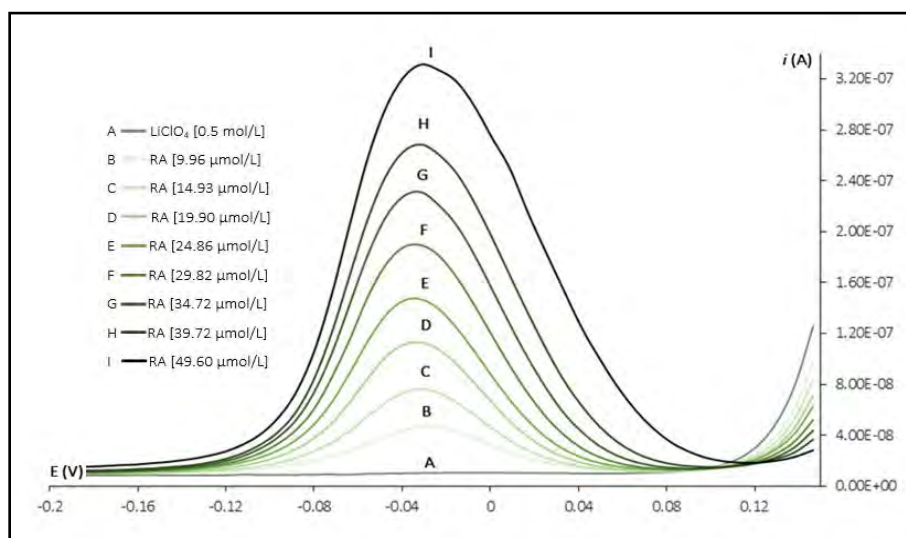
La señal en -1.68 V es atribuida a la reducción de los protones del ácido rosmarínico. En el potencial de -0.98 V no se observa dependencia lineal de la intensidad de corriente con respecto a la concentración del ácido. La señal en -0.33 V parece aumentar de manera lineal con la concentración, al igual que la señal de oxidación que se observa en -0.06 V; sin embargo, es la señal de oxidación la que muestra mayor sensibilidad, además de estar mejor definida.



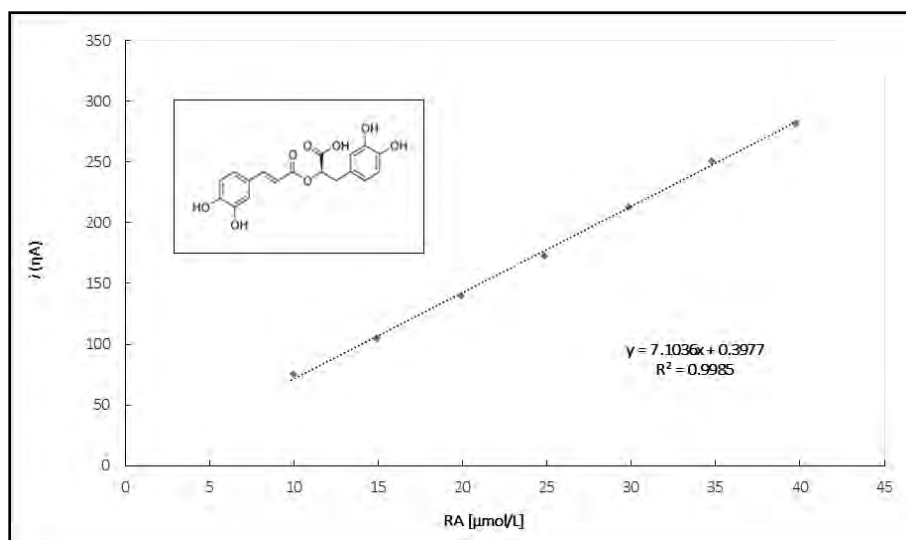
Gráfica 7. Curvas i/E en polarografía diferencial de impulsos del electrolito soporte LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua y de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico, dominio de electroactividad de 0.3 a -2.0 V.

Al comparar las gráficas 6 y 7, se puede observar que los potenciales de media onda ($E_{1/2}$) obtenidos con la técnica de polarografía clásica no son exactamente los mismos que los potenciales de pico (E_p) obtenidos con la polarografía diferencial de impulsos, pues están ligeramente desplazados, sin embargo, se puede asegurar que las señales son características del ácido rosmarínico y corresponden a los mismos procesos electroquímicos. La técnica de polarografía diferencial de impulsos posee mejor límite de detección (LDD) y mejor límite de cuantificación (LDC) que la polarografía clásica, por esa razón, para determinar la dependencia de la corriente con respecto a la concentración del ácido rosmarínico, es decir, qué señales del compuesto corresponden a procesos electroquímicos regidos por la difusión.

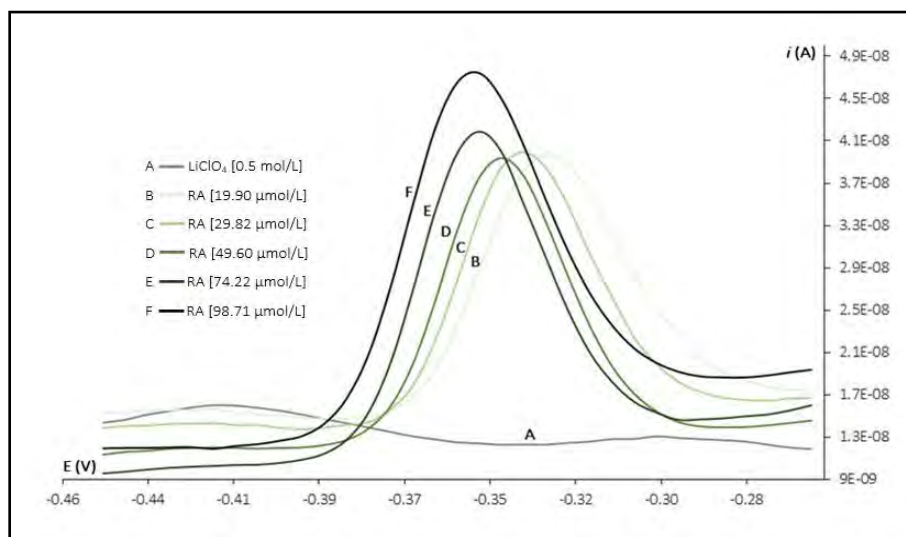
Se graficaron los valores de corriente de pico (i_p) en función de la concentración del ácido en disolución, a partir de los cuales se realizó una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. A continuación, se muestran las curvas i/E de las señales características del ácido rosmarínico de manera individual y su respectiva curva de calibración utilizando los valores de i_p obtenidos por polarografía diferencial de impulsos.



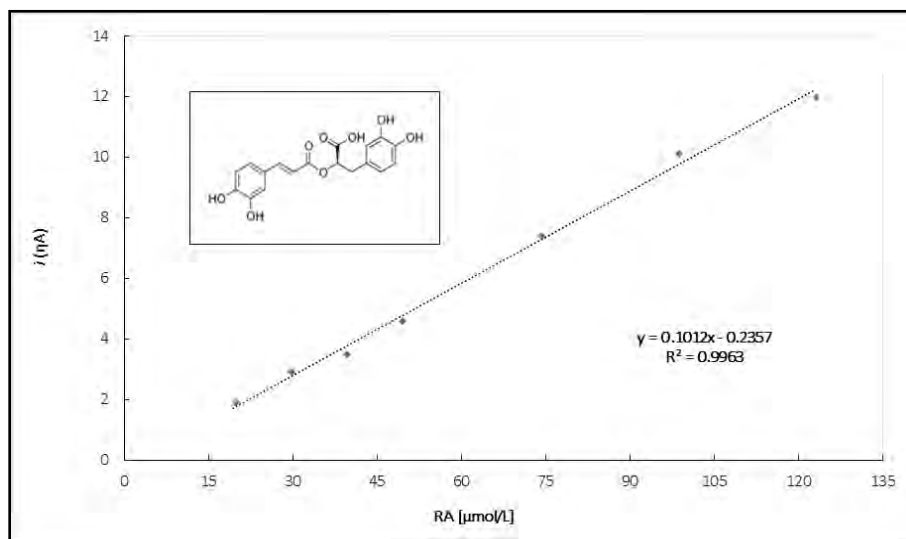
Gráfica 8. Curvas i/E de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; señales obtenidas con el método de polarografía diferencial de impulsos, $E_p = -0.03$ V.



Gráfica 9. Curva de calibración para la señal de oxidación en -0.06 V de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L].

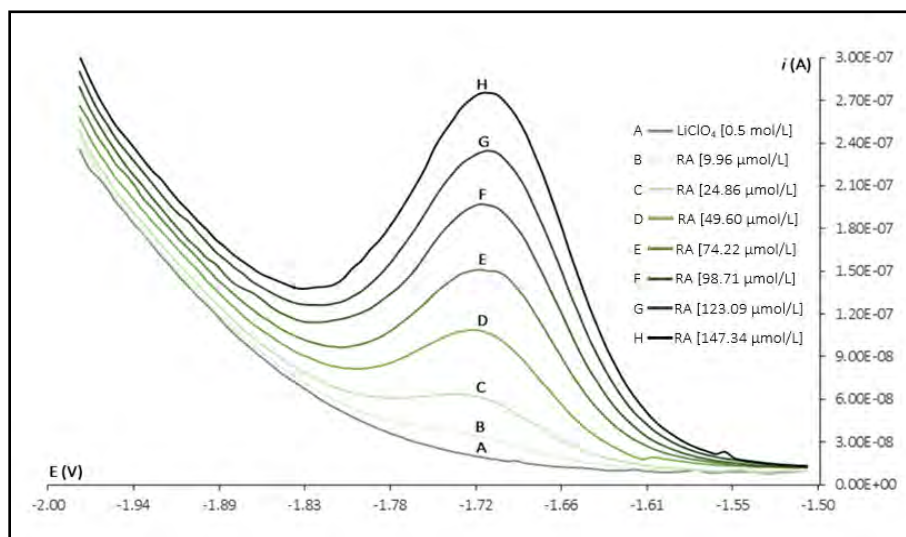


Gráfica 10. Curvas i/E de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; señales obtenidas con el método de polarografía diferencial de impulsos, $E_p = -0.36$ V.

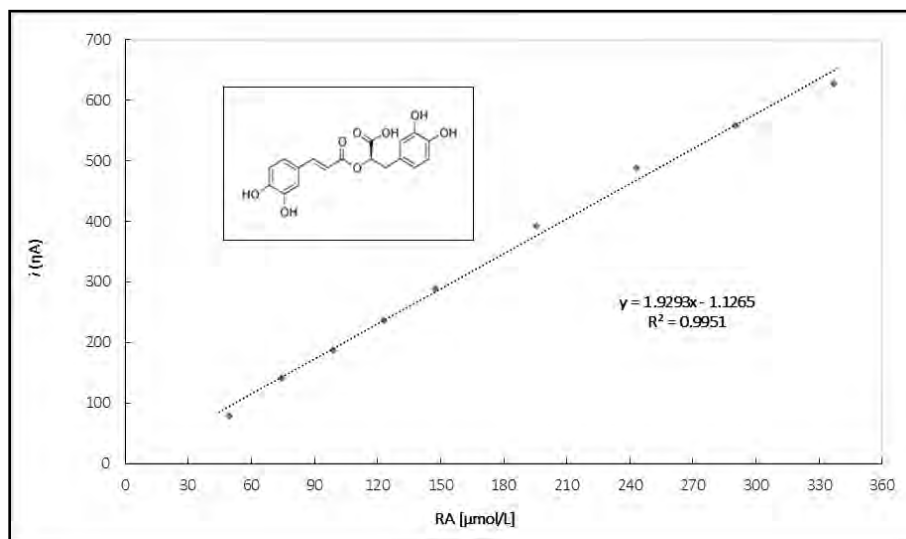


Gráfica 11. Curva de calibración para la señal de reducción en -0.33 V de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L].

La señal de reducción en -0.33 V muestra un elevado grado de correlación, pero, la sensibilidad es menor en comparación con la señal de oxidación en -0.06 V; esto se puede observar en los valores de corriente, donde las curvas características de la oxidación son 10 veces más grandes respecto a las curvas que corresponden a la reducción.



Gráfica 12. Curvas i/E de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 0.5 mol/L ; señales obtenidas con el método de polarografía diferencial de impulsos, $E_p = -1.71 \text{ V}$.



Gráfica 13. Curva de calibración para la señal de reducción en -1.68 V de ácido rosmarínico en LiClO_4 0.5 mol/L .

La señal de reducción obtenida en el potencial de -1.68 V corresponde al ácido rosmarínico, y los valores de corriente obtenidos en este potencial son directamente proporcionales a la concentración del ácido; sin embargo, la señal es atribuida a la reducción de uno o varios protones que contiene el ácido.

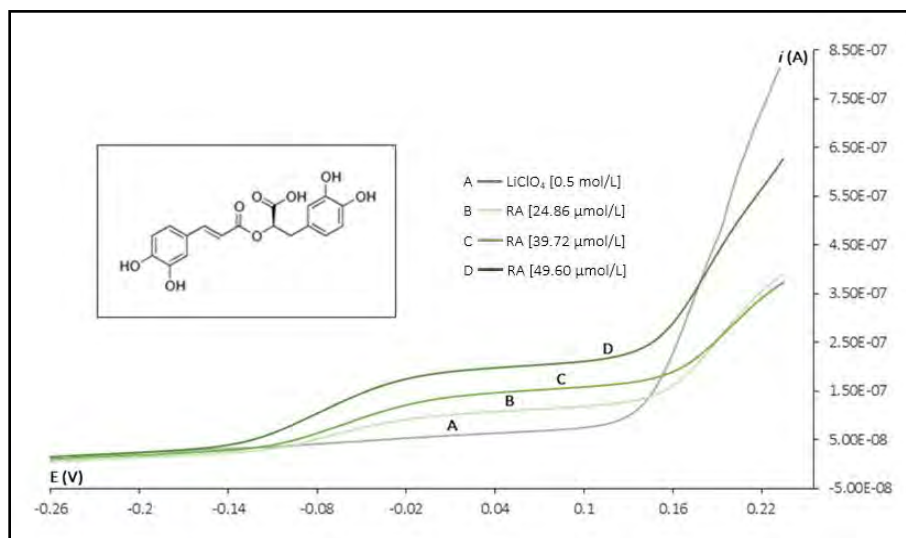
En diversos experimentos se logró comprobar que esta señal disminuye al agregar OH^- , mientras que las señales en -0.33 V y en -0.06 V no parecen sufrir cambios, ni en $E_{1/2}$ ni en i_d . Como se puede observar en la gráfica 13, existe una elevada correlación entre la corriente en el potencial de -1.68 V y la concentración del ácido rosmarínico, a pesar de ello, no es posible utilizar sólo esta señal para la detección o cuantificación del compuesto en otras muestras, ya que si la muestra analizada contiene otra sustancia que aporte protones, se observará una señal en este potencial; no obstante, la señal puede ser utilizada como parte del polarograma característico del ácido rosmarínico, complementando las demás señales correspondientes a la reducción y a la oxidación del compuesto. Se realizó la regresión lineal para esta señal, obteniendo un límite de detección de $1.61 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$ o 58.04 mg/L y un límite de cuantificación de $5.36 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$ o 193.48 mg/L . La señal de oxidación en -0.06 V y la señal de reducción en -0.36 V presentan una buena linealidad, es decir, que la corriente en esos potenciales tiene una relación directamente proporcional con respecto a la concentración, lo que indica que pueden resultar útiles para la cuantificación del ácido rosmarínico. De acuerdo con la regresión lineal realizada, se determinó que el límite de detección (LDD) para la señal en -0.06 V corresponde a $2.22 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$, es decir, 0.80 mg/L y un límite de cuantificación (LDC) de $7.38 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ o 2.66 mg/L ; para la señal en -0.36 V se tiene un límite de $9.70 \times 10^{-7}\text{ mol/L}$ o 0.35 mg/L y un límite de cuantificación de $3.23 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ o 1.16 mg/L .

$E_{1/2}$ (V)	E_p (V)	Reacción	LDD (mg/L)	LDC (mg/L)
-0.06	-0.03	Oxidación	0.80	2.66
-0.36	-0.33	Reducción	0.35	1.16
-1.68	-1.71	Reducción	58.04	193.48

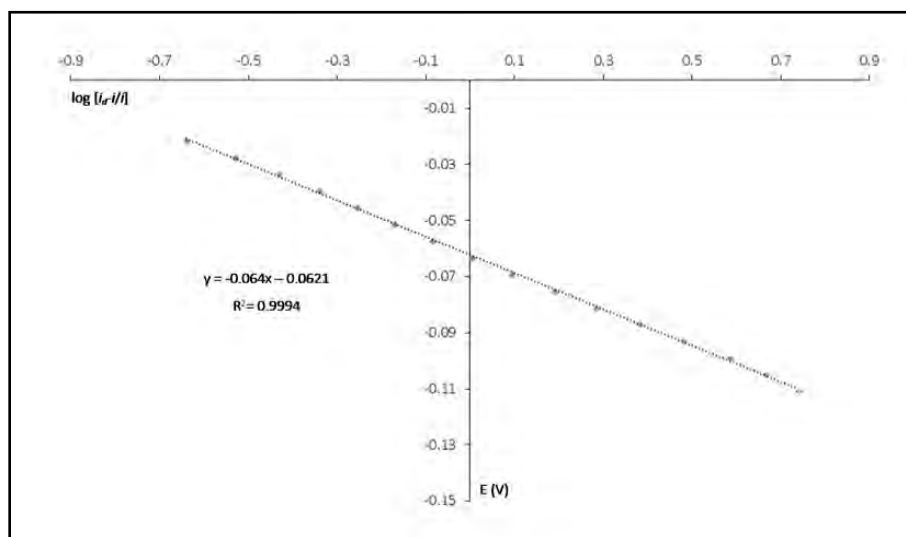
Tabla 5. Cuadro comparativo de los límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC) de las señales características del ácido rosmarínico.

La señal de reducción en -0.98 V no muestra dependencia lineal con respecto a la concentración del ácido, adicionalmente, los valores de E_p en este potencial muestran variaciones que van desde -0.98 a -1.08 V , lo que dificulta el uso de esta señal para la cuantificación del compuesto en otras muestras.

Debido a que la señal en -0.06 V depende linealmente de la concentración del ácido rosmarínico, se realizó un estudio logarítmico para verificar la idealidad del sistema electroquímico con la ecuación de Nernst y a su vez se aplicó el modelo de Tafel para evaluar su reversibilidad.

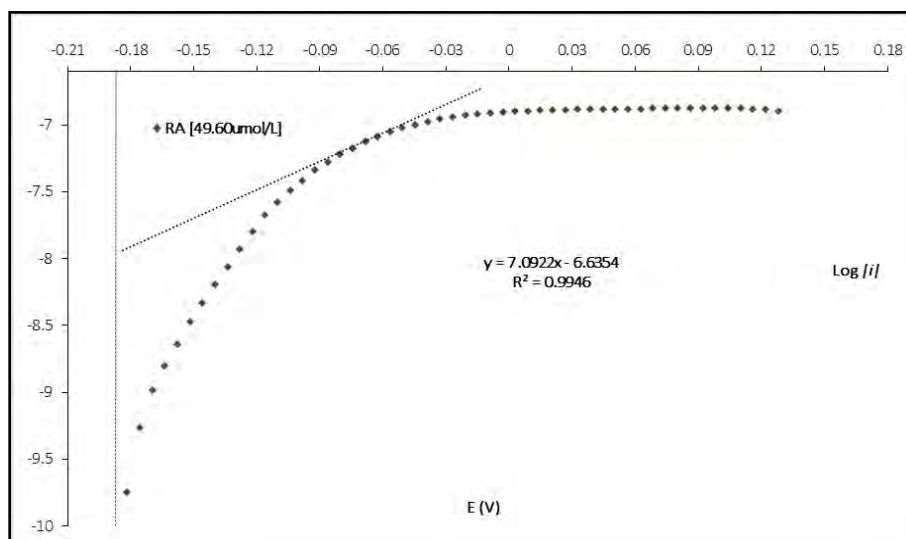


Gráfica 14. Curvas i/E en polarografía clásica del electrolito soporte LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua y de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico, señal de oxidación en -0.06 V.



Gráfica 15. Análisis logarítmico de la señal de oxidación en -0.06 V del ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua.

El valor de la ordenada al origen para el análisis logarítmico indica que la señal de oxidación posee un $E_{1/2} = -0.0621$ V y, ya que el valor de la pendiente de la recta es muy cercano a 0.059, se puede considerar que el número de electrones involucrados en la oxidación electroquímica (n) es de 1, si se presenta comportamiento nernstiano, o mayor a 1 si no se presenta comportamiento nernstiano.



Gráfica 16. Gráfico de Tafel de la señal de oxidación en -0.06 V del ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L].

De acuerdo con la gráfica 16, al realizar el tratamiento matemático descrito en la sección de anexos, se obtienen los siguientes parámetros del sistema redox según la ecuación de Tafel:

Parámetro	Valor
$\log i_0$	-7.98
i_0	1.05×10^{-8} A
m	7.092
αn	0.419
α (si $n=2$)	0.209

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la ecuación de Tafel para la oxidación del ácido rosmarínico en -0.06 V.

Los criterios importantes para evaluar la cinética de las reacciones electroquímicas son la corriente de intercambio (i_0) y el coeficiente de transferencia de carga (α), de acuerdo con la ecuación de Tafel:

$$\log i = \log i_0 + \frac{\alpha n F}{2.3 RT} * \eta$$

Para la señal de oxidación del ácido rosmarínico se obtiene un valor de corriente de intercambio de $i_0 = 1.05 \times 10^{-8}$ A, lo cual indica que el sistema es lento, es decir, que la velocidad de transferencia de electrones está influida por algún fenómeno, que puede ser de adsorción, la presencia de reacciones químicas acopladas o la misma naturaleza y condiciones del medio de estudio o electrolito soporte. De la misma manera se obtiene un valor de coeficiente de transferencia de carga $\alpha = 0.209$, suponiendo que se intercambien 2 electrones, que también indica que el sistema es lento, pues los sistemas cinética rápida poseen valores cercanos a 0.5.

5.6 Valoraciones complejométricas

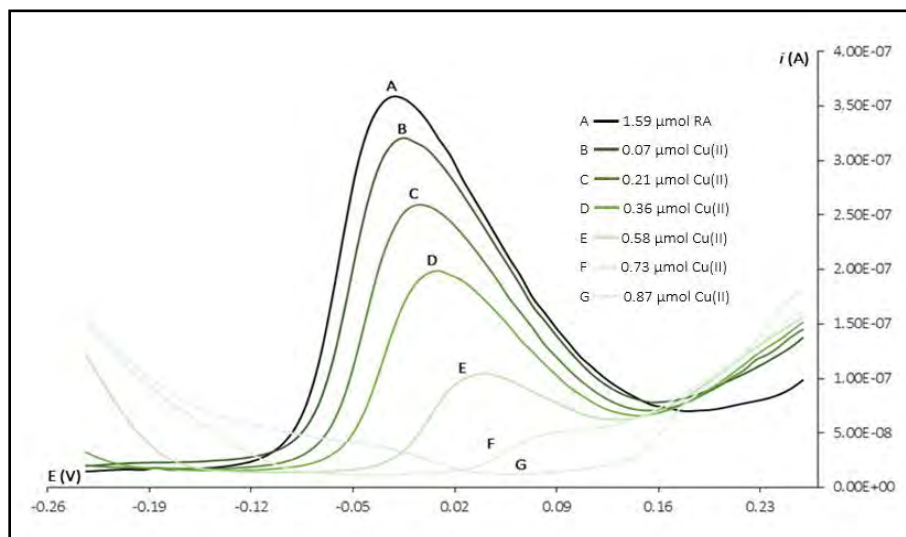
Se estudió el equilibrio de complejación del ácido rosmarínico con Cu(II) y Hg(II). Las curvas i/E del ácido rosmarínico cambian en el curso de la valoración con cada uno de estos cationes. Se parte de una cantidad de ácido rosmarínico constante, observando las señales voltamperométricas mostradas en la sección 5.5; cualquier cambio en dichas curvas puede ser atribuido a la adición del catión valorante; cualitativamente esto se refleja de las siguientes formas:

- 1) Disminución en la corriente de pico (i_p) del ácido rosmarínico (se eligió la señal de oxidación en -0.06 V).
- 2) Desplazamiento del potencial de pico (E_p), que es equivalente al potencial de media onda ($E_{1/2}$) en polarografía clásica.
- 3) Aparición de una nueva señal, lo que ocurre si se forma un complejo soluble y electroactivo, si hay exceso de catión valorante en el medio o si no hay reacción entre ambas especies (apareciendo una señal desde la primera adición de catión).

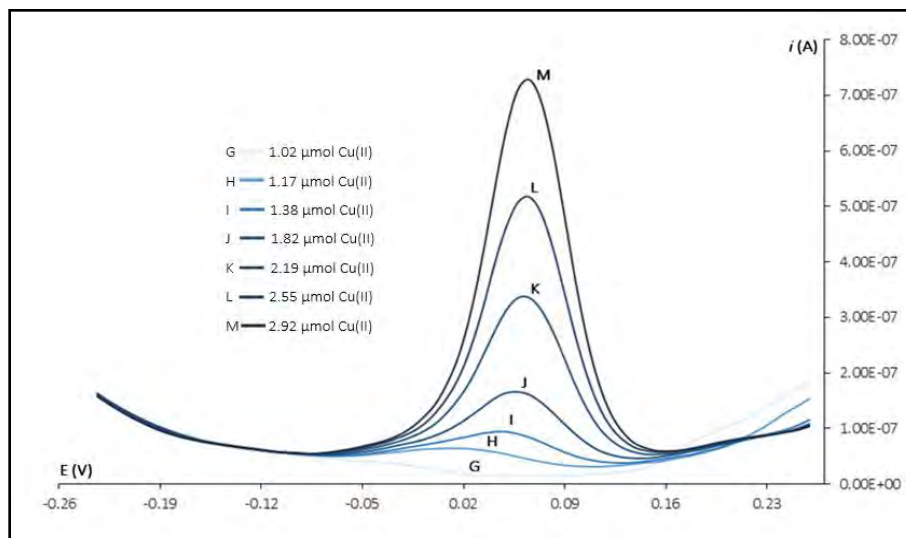
Si se mide la variación en la corriente de pico (i_p) de la señal en -0.06 V en función de la relación de (moles agregados de catión) / (moles totales de ácido rosmarínico) se obtienen gráficas con zonas lineales cuyas intersecciones indican la relación molar o estequiometría del complejo formado.

5.6.1 Complejos de ácido rosmarínico con Cu(II)

Para este estudio se realizaron adiciones de distintas alícuotas de una disolución de Cu(II) con una concentración de 0.00731 mol/L (previamente estandarizada) a la celda polarográfica que contenía ácido rosmarínico, se obtuvieron las curvas i/E respectivas de cada adición de catión utilizando el método de polarografía diferencial de impulsos. Las señales características del ácido rosmarínico se desplazaron hacia valores mayores de potencial, al mismo tiempo que ocurrió una variación de su intensidad de corriente de pico (i_p). Para ejemplificar el comportamiento observado de la reacción, se utilizó la señal en -0.06 V obtenida después de cada adición a 1.59 μ moles de ácido rosmarínico; la señal en este potencial fue utilizada debido a que presenta mayor sensibilidad. Al realizar adiciones de catión Cu(II), el valor de i_p en -0.06 V fue disminuyendo como se muestra en la gráfica 17; al continuar las adiciones de catión, se observó una nueva señal que fue aumentando ligeramente, como se muestra en la gráfica 18, llegando a tener un E_p similar al potencial de pico característico del Cu(II) libre, observado en otros experimentos.

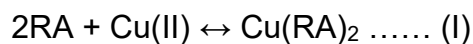


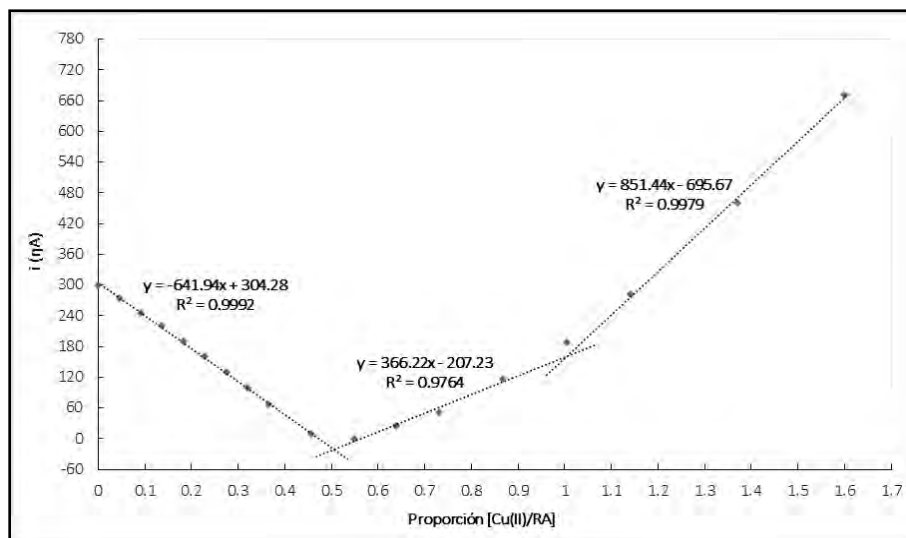
Gráfica 17. Curvas i/E de diferentes adiciones de Cu(II) a 1.59 μ mol de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; señales obtenidas con el método diferencial de impulsos en el intervalo de potencial de -0.3 a 0.3 V.



Gráfica 18. Curvas i/E de diferentes adiciones de Cu(II) a $1.59 \mu\text{mol}$ de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; señales obtenidas con el método diferencial de impulsos en el intervalo de potencial de -0.3 a 0.3 V .

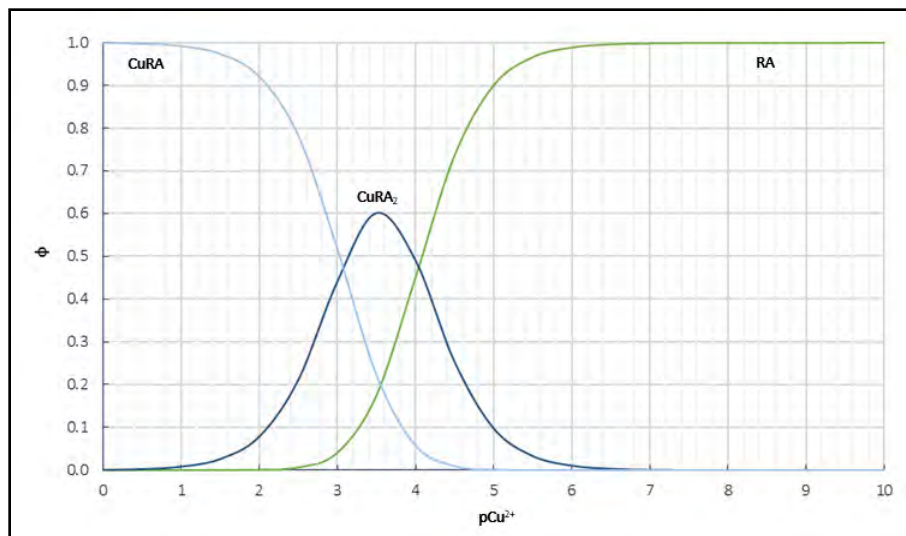
Al graficar la variación de la corriente de pico de la señal en -0.06 V en función de la relación molar $[\text{Cu(II)}/\text{RA}]$ (gráfica 19), se observa que el valor de i_p varía de tal forma que disminuye en el intervalo de 0 a 0.5 de la relación molar $[\text{Cu(II)}/\text{RA}]$, se incrementa ligeramente de 0.5 a 1.0, y para valores mayores a 1.1 aumenta de forma apreciable, lo cual puede ser debido a un exceso de catión en disolución. Al calcular la intersección entre cada una de estas rectas se obtienen los valores de $x = 0.507$ ($x \approx 0.5$) y $x = 1.001$ ($x \approx 1$), que indican la formación de los complejos Cu(RA)_2 y CuRA , que se forman en el orden indicado debido al exceso inicial de ácido rosmarínico con respecto al Cu(II) durante la valoración. Lo anterior quiere decir que durante la valoración se llevan a cabo los siguientes equilibrios:





Gráfica 19. Curva de corriente de pico (i_p) en -0.06 V vs. relación molar $[Cu(II)/RA]$.

Los equilibrios planteados arriba explican el hecho de que, durante la valoración, la i_p de la señal en -0.06 V disminuya en el intervalo de 0 a 0.5 de la relación molar, pues la concentración del ácido rosmarínico libre en disolución disminuye al formarse el complejo $Cu(RA)_2$, como también explican el aumento de i_p en el intervalo de 0.5 a 1.0 por el consiguiente aumento de la concentración del ácido rosmarínico debido a la transformación del complejo antes formado en el complejo $CuRA$, e incluso que i_p siga aumentando debido al exceso de catión agregado. La gráfica 19 además de proporcionar la estequiometría de los complejos formados, permite calcular sus respectivas constantes, puesto que la corriente de pico en -0.06 V es proporcional a la concentración del ácido rosmarínico libre y, de forma indirecta, las concentraciones de las demás especies; al conocer la concentración de todas las especies involucradas en el equilibrio, se procede a sustituir estos valores en la expresión de la constante de equilibrio y a calcular dicha constante. La metodología para el cálculo de los valores está descrita a detalle en la sección de anexos. Se obtuvieron valores de 4.04 y 7.11 para $\log \beta_i$ de los complejos $CuRA$ y $Cu(RA)_2$ respectivamente (es decir, $pK_{dis1} = 4.04$ y $pK_{dis2} = 3.07$). Con las constantes de formación globales (β_i) obtenidas, se calculó el diagrama de abundancia relativa de especies para la formación de complejos $Cu(II)$ - RA , con los cuales se pretende tener una descripción gráfica de los equilibrios en disolución para las reacciones de formación de complejos antes descritas.

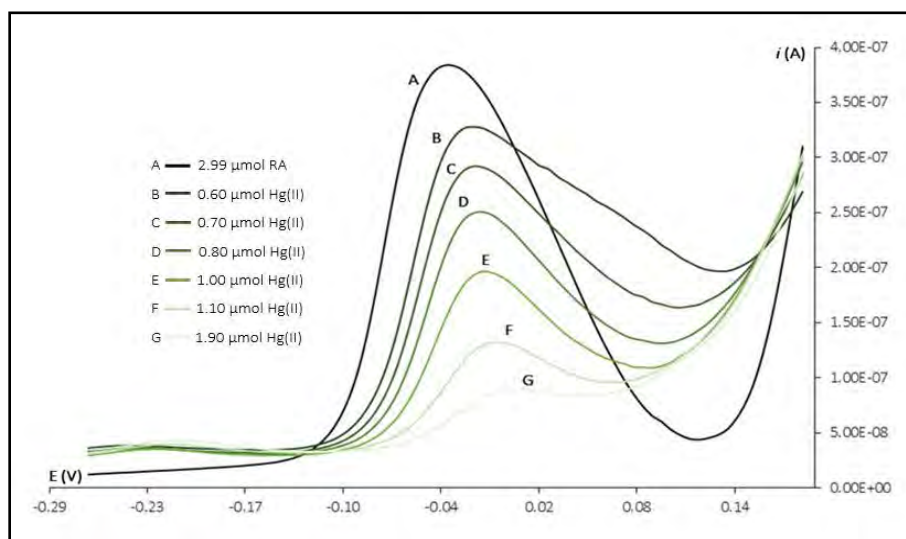


Gráfica 20. Diagrama de abundancia relativa de especies para los complejos de ácido rosmarínico con Cu(II).

En el diagrama de abundancia relativa de especies se observa que a una concentración de Cu²⁺ mayor a 8.51×10^{-4} mol/L ($pCu^{2+} < 3.07$) predomina el complejo CuRA; en el intervalo de concentración de 8.51×10^{-4} a 9.12×10^{-5} mol/L ($3.07 < pCu^{2+} < 4.04$) predomina la especie CuRA₂, cuya fracción molar máxima en este intervalo es de 0.60; mientras que a una concentración de Cu²⁺ menor a 9.12×10^{-5} mol/L ($pCu^{2+} > 4.04$) predomina el ácido rosmarínico libre.

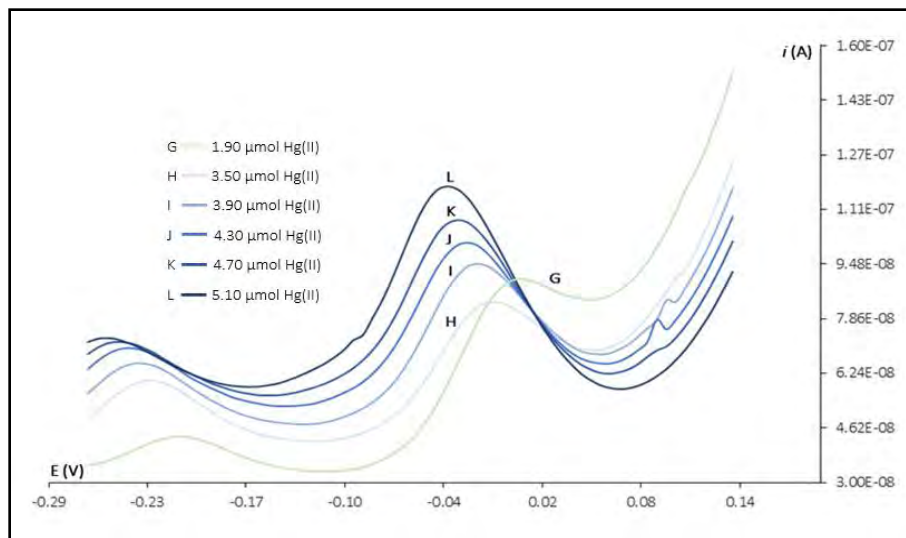
5.6.2 Complejos de ácido rosmarínico con Hg(II)

Para ejemplificar el comportamiento observado de la reacción, se utilizó la señal en -0.06 V obtenida después de cada adición a 2.99 μmol de ácido rosmarínico, la señal en este potencial fue utilizada debido a que presenta mayor sensibilidad.



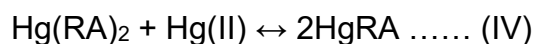
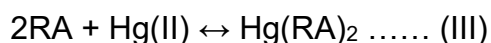
Gráfica 21. Curvas i/E de diferentes adiciones de Hg(II) a 2.99 μmol de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; señales obtenidas con el método diferencial de impulsos en el intervalo de potencial de -0.3 a 0.3 V.

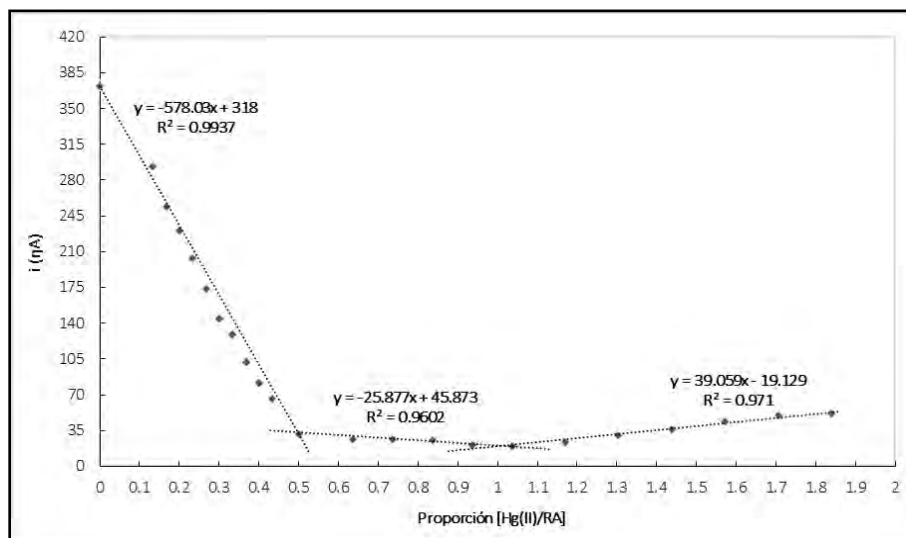
Durante la valoración de ácido rosmarínico con Hg(II), la corriente de pico de la señal en -0.06 V disminuye, lo cual se atribuye a la disminución del ácido en su forma libre en disolución, mientras que aparece otra señal entre -0.01 y -0.02 V, que se atribuye a la formación del complejo.



Gráfica 22. Curvas i/E de diferentes adiciones de Hg(II) a 2.99 μmol de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; señales obtenidas con el método diferencial de impulsos en el intervalo de potencial de -0.3 a 0.3 V.

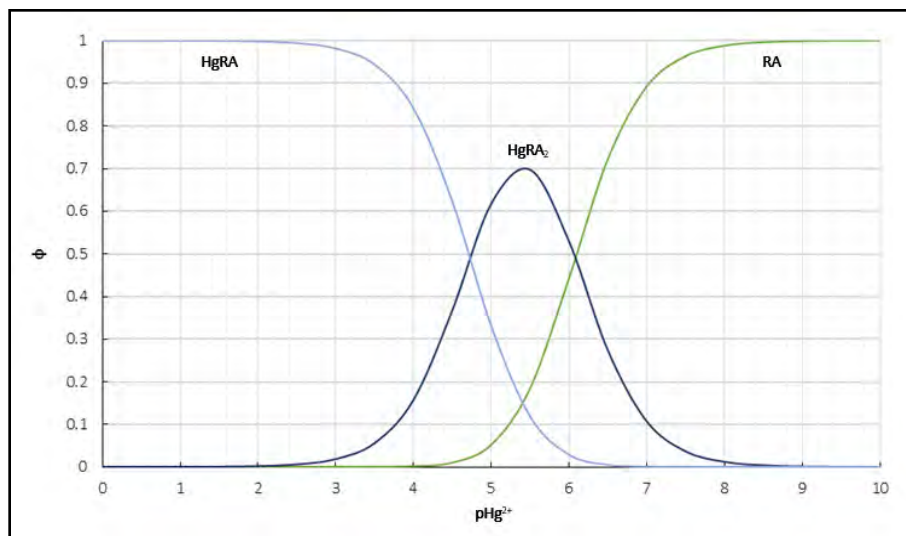
Al graficar los valores obtenidos de i_p en -0.06 V vs. la relación molar $[\text{Hg(II)}/\text{RA}]$ se observan 3 zonas rectas. En la primera, el valor de i_p disminuye en el intervalo de 0 a 0.5 de la relación molar $[\text{Hg(II)}/\text{RA}]$, de 0.5 a 1.0 continúa disminuyendo, y para valores mayores a 1.1 aumenta ligeramente. Al calcular la intersección entre cada una de estas rectas se obtiene los valores de $x= 0.493$ ($x \approx 0.5$) y $x= 1.001$ ($x \approx 1$), que indican la formación de los complejos Hg(RA)_2 y HgRA , que se forman en el orden mencionado debido al exceso inicial de ácido rosmarínico con respecto al Hg(II) durante la valoración. Lo anterior quiere decir que durante la valoración se llevan a cabo los siguientes equilibrios:





Gráfica 23. Curva de corriente de pico (i_p) en -0.06 V vs. relación molar $[\text{Hg(II)}/\text{RA}]$.

Los equilibrios planteados (III) y (IV) explican el hecho de que, durante la valoración, la i_p de la señal en -0.06 V disminuya en el intervalo de 0 a 0.5 de la relación molar y posteriormente en el intervalo de 0.5 a 1.0, pues la concentración de ácido rosmarínico libre disminuye, hasta llegar a una relación molar 1:1, donde la corriente de pico aumenta levemente debido al exceso de Hg(II) . Para esta valoración se obtuvieron valores de 6.08 y 10.81 para $\log \beta_i$ de los complejos HgRA y Hg(RA)_2 respectivamente (es decir, $\text{pK}_{\text{dis}1} = 6.08$ y $\text{pK}_{\text{dis}2} = 4.73$). Una vez más, con las constantes de formación globales (β_i) obtenidas, se calculó el siguiente diagrama de abundancia relativa de especies, que permite tener una descripción gráfica de los equilibrios en disolución para las reacciones de formación de complejos Hg(II)-RA .



Gráfica 24. Diagrama de abundancia relativa de especies para los complejos de Hg(II) con ácido rosmarínico.

En este diagrama se puede observar que a una concentración de Hg^{2+} mayor a 1.86×10^{-5} mol/L ($\text{pHg}^{2+} < 4.73$) predomina el complejo HgRA; en el intervalo de concentración de Hg^{2+} de 1.86×10^{-5} a 8.32×10^{-7} mol/L ($4.73 < \text{pHg}^{2+} < 6.08$) predomina el complejo HgRA₂, cuya fracción molar máxima en este intervalo de 0.7; y para concentraciones menores a 8.32×10^{-7} mol/L, es decir $\text{pHg}^{2+} > 6.08$, predomina el ácido rosmarínico libre. El resultado del análisis de las curvas presentadas se puede resumir en la siguiente tabla:

Catión	Complejos formados	Log β_i
Cu^{2+}	CuRA, Cu(RA) ₂	4.04, 7.11
Hg^{2+}	HgRA, Hg(RA) ₂	6.08, 10.81

Tabla 7. Valores de log β_i obtenidos en la complejación de ácido rosmarínico con cationes metálicos.

5.7 Cuantificación del ácido rosmarínico en extractos naturales

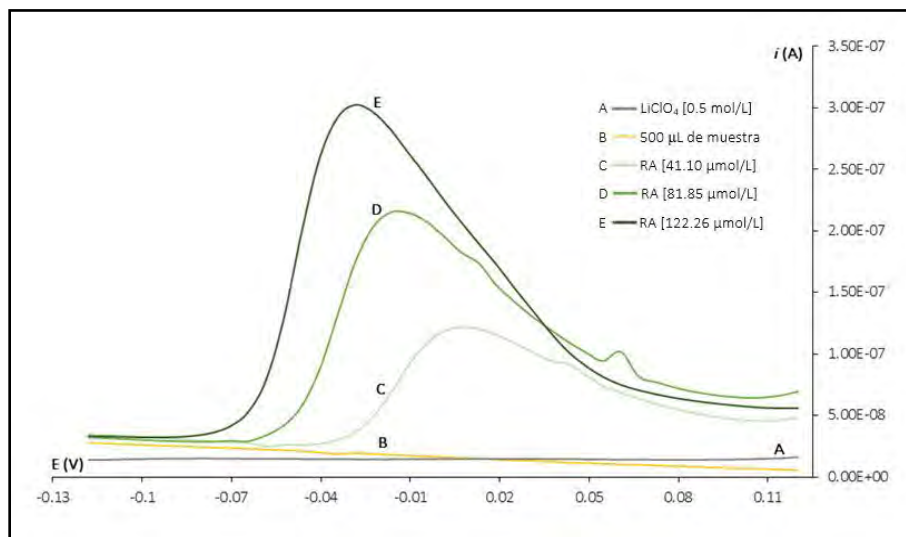
El conocimiento de las curvas i/E del ácido rosmarínico permite saber si es posible la determinación del compuesto en una muestra problema. Para la cuantificación se contó con 4 productos comerciales y un extracto etanólico de romero descritos a continuación:

1. Destilado natural de romero, marca Naturland
2. Destilado natural de romero (100% puro), marca Attar
3. Aceite de romero al 10% marca WALA
4. Aceite de romero al 10% marca WELEDA
5. Extracto de romero en etanol-agua (90:10 v/v)

Antes de comenzar los experimentos, se realizaron pruebas de solubilidad en agua de los productos antes mencionados; los resultados obtenidos en estas pruebas mostraron que los destilados son totalmente solubles en el medio, en cambio los aceites no. Para realizar el estudio de los destilados bastó con realizar una dilución del destilado marca Attar (como se explica más adelante), mientras que el destilado marca Naturland fue agregado directamente a la celda. Por el contrario, para el estudio de los aceites fue necesario realizar una extracción líquido-líquido tal y como se indica en el apartado **4.9**. Como electrolito soporte se utilizaron 20.0 mL de una disolución de LiClO_4 0.5 mol/L, en el caso de los destilados, el electrolito soporte fue preparado en agua; sin embargo, para el estudio de los aceites, el electrolito soporte fue preparado en agua-alcohol, con una proporción 50:50; para eliminar el oxígeno disuelto en el electrolito soporte se burbujeó nitrógeno por 10 minutos, una vez eliminado el oxígeno se realizaron los barridos de potencial para obtener los polarogramas $i = f(E)$ del medio, con las técnicas de polarografía clásica y polarografía diferencial de impulsos. Se realizaron de 3 a 5 adiciones de muestra problema, tomando volúmenes de 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 50.0 o 100.0 μL ; posteriormente se hicieron de 5 a 7 adiciones de disolución patrón de 10.0, 20.0, 30.0 o 50.0 μL ; antes de comenzar el barrido, para cada adición de muestra problema y de disolución patrón se burbujeó nitrógeno por 30 segundos para eliminar el posible oxígeno disuelto.

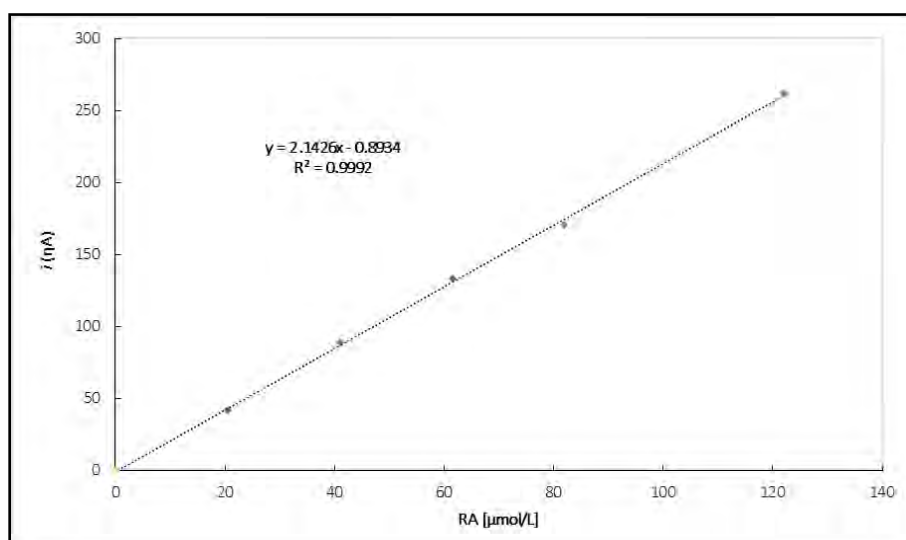
5.7.1 Destilado de romero marca Naturland

Se realizaron adiciones del destilado de romero marca Naturland, el volumen total adicionado de muestra fue de 500.0 μL y sólo se observó una señal de reducción en el potencial de -1.36 V que, a pesar de aumentar de forma proporcional, no es característica del ácido rosmarínico en este medio; siguiendo la metodología de adiciones patrón, se realizaron adiciones de la disolución de ácido rosmarínico 0.0099 mol/L, observando el aumento de la corriente de pico de las señales características del ácido y aunque las señales fueron desplazadas levemente a potenciales mayores, se puede asegurar que son las señales características del ácido rosmarínico; a continuación se muestra el polarograma obtenido con la técnica de polarografía diferencial de impulsos en el intervalo de -0.13 a 0.13 V, donde aparece la señal correspondiente a la oxidación del ácido; cabe mencionar que también se observaron las señales de reducción características del compuesto pero para fines prácticos se muestra sólo la señal utilizada para la cuantificación.



Gráfica 25. Curvas i/E de destilado de romero Naturland y de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; polarogramas obtenidos con la técnica diferencial de impulsos en el intervalo de -0.13 a 0.13 V.

En la gráfica 25, se puede observar el aumento de la i_p en -0.03 V al agregar alícuotas de la disolución patrón, mientras que en la curva de la última adición de destilado Naturland, no se observa la señal característica del ácido en este potencial e incluso es muy similar a la curva correspondiente al electrolito soporte. Las curvas i/E del destilado de romero marca Naturland permiten tener una conclusión sobre el producto, al no observar señal alguna en los potenciales de media onda correspondientes a las dos reducciones y a la oxidación del compuesto; lo que se puede concluir sobre este destilado, es que no contiene ácido rosmarínico o en su defecto tiene menos de 0.80 mg/L, que es el límite de detección del método para la señal de oxidación del ácido. Se graficaron los valores de corriente de pico obtenidos vs. la concentración del ácido rosmarínico en celda.

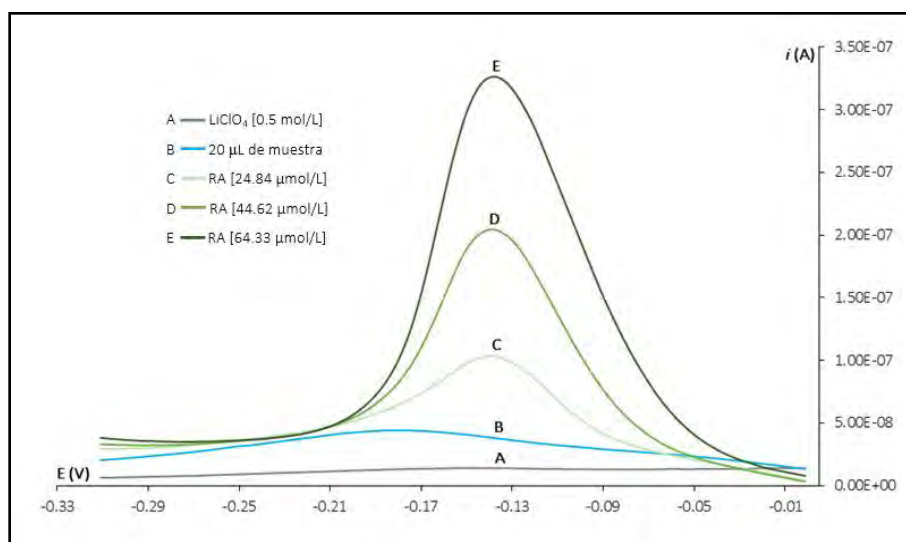


Gráfica 26. Curva de corriente de pico i_p vs. diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua, destilado Naturland; señal de oxidación en el potencial de -0.03 V.

La conclusión sobre este producto es apoyada con el hecho de que el destilado no es fresco, es decir, el producto se adquirió hace más de 5 años y existe la posibilidad de que algunos compuestos como el ácido rosmarínico hayan pasado por algún proceso de descomposición durante su almacenamiento.

5.7.2 Destilado de romero marca Attar

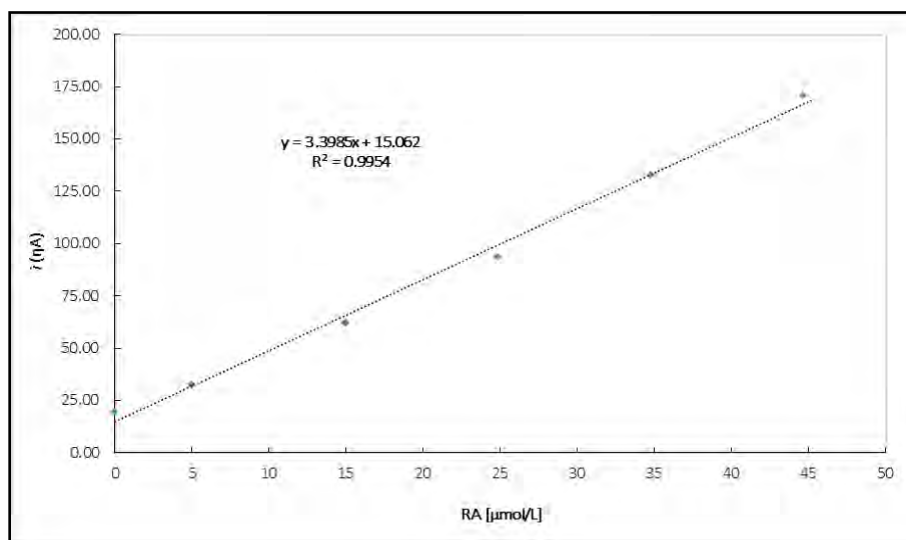
Para realizar el análisis de este producto fue necesario diluir una muestra; se tomaron 3.0 mL de destilado y se colocaron en un matraz volumétrico de 10.0 mL, se agregó etanol absoluto hasta la marca de aforo, de esta disolución se tomaron alícuotas de 10.0 μL para trazar las curvas i/E . En este caso, y a diferencia del destilado Naturland, se observaron las señales características del ácido rosmarínico; una señal de oxidación en el potencial de -0.13 V y dos señales de reducción, una en -0.40 V que apareció después de la segunda adición y otra en -1.8 V (señal correspondiente a la reducción del protón), que aumentaron al agregar destilado, y posteriormente siguieron aumentando al agregar disolución patrón de ácido rosmarínico. Para fines prácticos se muestra sólo la señal de oxidación, utilizada para la cuantificación.



Gráfica 27. Curvas i/E de destilado de romero Attar y de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; polarogramas obtenidos con la técnica diferencial de impulsos en el intervalo de -0.33 a 0 V.

Las curvas i/E permiten deducir que este destilado sí contiene ácido rosmarínico.

Las señales observadas están ligeramente desplazadas hacia potenciales mayores; sin embargo, se puede asegurar que corresponden a los procesos redox característicos del ácido. A continuación, se muestra una gráfica de los valores de corriente de pico obtenidos en la última adición de destilado y de las adiciones de la disolución patrón vs. la concentración del ácido rosmarínico en celda. Se tomó el valor de corriente de pico de la señal de oxidación en -0.13 V para la cuantificación del compuesto en la muestra comercial.

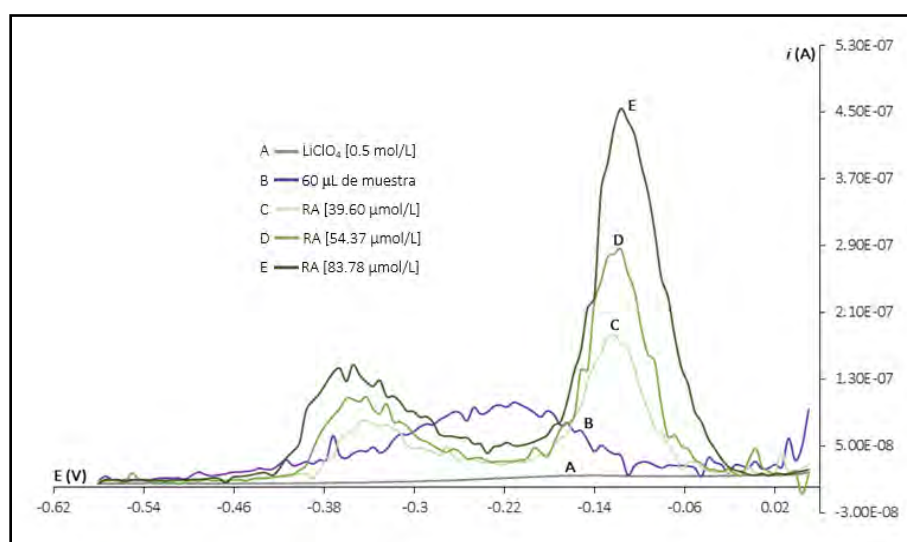


Gráfica 28. Curva de corriente de pico i_p vs. diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua, destilado Attar; señal de oxidación en el potencial de -0.13 V.

Para la cuantificación del ácido rosmarínico en este destilado se tomó el valor de i_p de la última adición de destilado y se sustituyó en la ecuación de la recta de la curva de adiciones patrón, obteniendo una cantidad de 8.58×10^{-8} moles totales en la celda antes de adicionar disolución patrón; considerando la dilución realizada y los volúmenes utilizados en las adiciones de destilado, se obtuvo una concentración de 1.64×10^{-2} mol/L o 5909 mg/L de ácido rosmarínico en la muestra original.

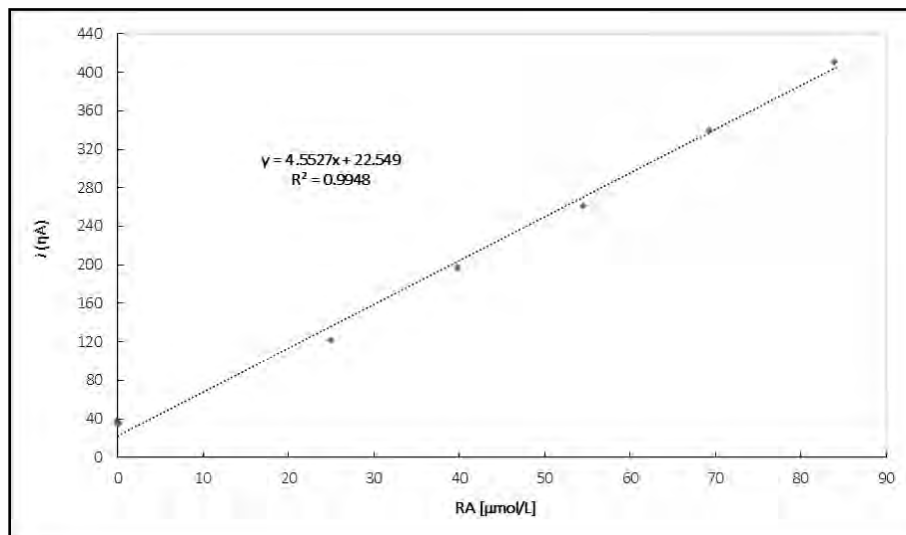
5.7.3 Aceite de romero marca WALA

Para la cuantificación del compuesto en los aceites se realizó una extracción líquido-líquido tal y como se indica en el apartado 4.9; sin embargo, se observó que la mayor parte del ácido es extraída con la primera adición de alcohol, por lo tanto, el procedimiento de extracción consistió en tomar una alícuota de 3.0 mL de cada aceite y colocar cada uno en un tubo de ensayo con rosca, se adicionaron 3.0 mL de etanol absoluto a cada tubo, se tapó y se agitó vigorosamente; una vez separadas las fases, se tomaron alícuotas de 5.0 y 10.0 μL de la fase alcohólica para el estudio, posteriormente se adicionaron las alícuotas de disolución patrón. Después de cada adición de ácido rosmarínico se burbujeó nitrógeno por 30 segundos para eliminar el posible oxígeno disuelto. Es importante mencionar que el electrolito soporte en este caso fue preparado en agua-alcohol con la finalidad de evitar turbiedad en la celda debida a la naturaleza del aceite y con ello interferencias en la celda, se comprobó que las señales características del ácido rosmarínico están ligeramente desplazadas en este medio, pero no son afectadas de manera apreciable.



Gráfica 29. Curvas i/E de aceite de romero WALA y de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; polarogramas obtenidos con la técnica diferencial de impulsos en el intervalo de -0.62 a 0 V.

En la gráfica 29 se puede observar la curva correspondiente a la última adición de extracto (B), señal que corresponde a la oxidación del ácido rosmarínico; en este caso, aparece inicialmente en el potencial de -0.21 V, pero con las adiciones de disolución patrón se desplazan ligeramente hacia potenciales menos negativos; las señales de reducción del ácido rosmarínico también aparecen desplazadas al inicio, respecto al potencial de media onda característico del compuesto obtenido de la disolución patrón, a pesar de ello, con cada adición de patrón de ácido rosmarínico, las señales se mueven ligeramente hacia potenciales menos negativos, al mismo tiempo que el valor de la corriente de pico aumenta. Se graficaron los valores de corriente de pico obtenidos tras cada adición de disolución patrón vs. la concentración del ácido en celda.

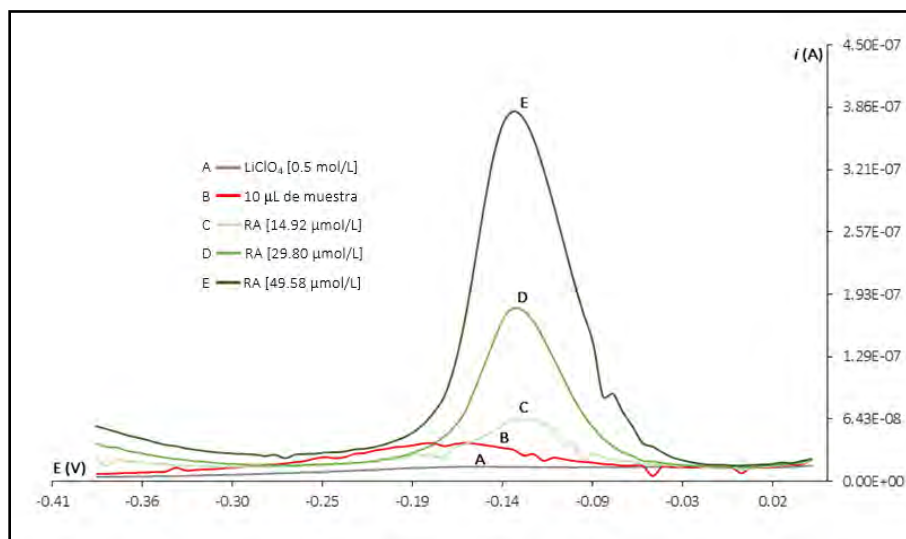


Gráfica 30. Curva de corriente de pico i_p vs. diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua-alcohol, aceite WALA; señal de oxidación en el potencial de -0.12 V.

La curva de adiciones estándar permite comparar el valor de i_p obtenido del extracto en la señal de oxidación que se observa en -0.12 V con las i_p correspondientes a las adiciones patrón y así calcular la cantidad de ácido rosmarínico en esta muestra. Al considerar las diluciones realizadas se obtiene una concentración de 7.03×10^{-3} mol/L o 2532.97 mg/L de ácido en el aceite.

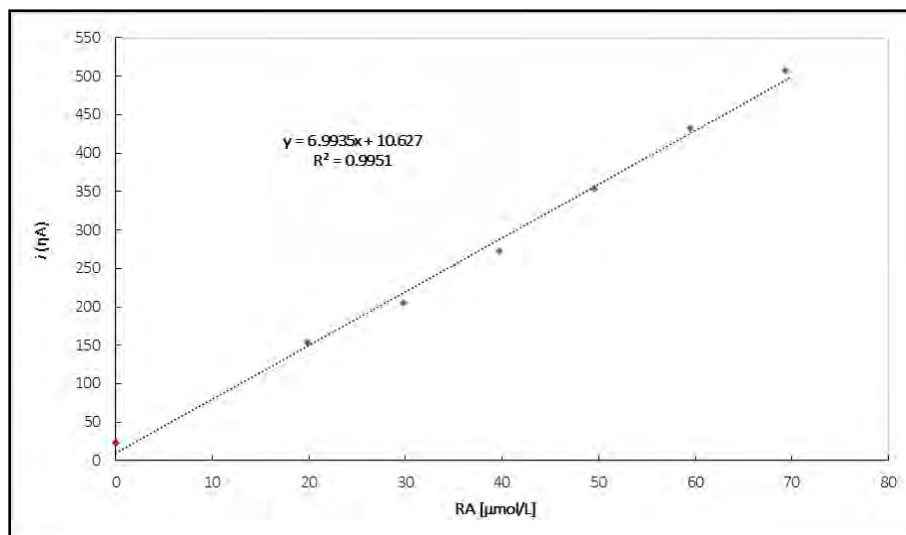
5.7.4 Aceite de romero marca WELEDA

La cuantificación en este aceite se realizó de la misma forma que con el aceite anterior, bajo las mismas condiciones de operación: potencial inicial 500 mV, potencial final -2000 mV, velocidad de barrido 6 mV/s, tiempo de goteo 1.0 s. Después de cada adición de ácido rosmarínico se burbujeó con nitrógeno por 30 segundos para eliminar el posible oxígeno disuelto. Se tomaron alícuotas de la fase alcohólica una vez realizada la extracción líquido-líquido con etanol absoluto. El electrolito soporte fue preparado en agua-etanol para favorecer la solubilidad de los compuestos en el medio. En esta determinación se observan las señales características del ácido rosmarínico, que van aumentando con la adición de muestra problema y a su vez con las adiciones de la disolución patrón.



Gráfica 31. Curvas i/E de aceite de romero WELEDA y de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; polarogramas obtenidos con la técnica diferencial de impulsos en el intervalo de -0.41 a 0 V.

La señal de oxidación, utilizada para la cuantificación, aparece inicialmente en el potencial de -0.16 V, al adicionar disolución patrón la señal aumenta, y al mismo tiempo, las curvas se desplazan ligeramente hacia potenciales menos negativos.

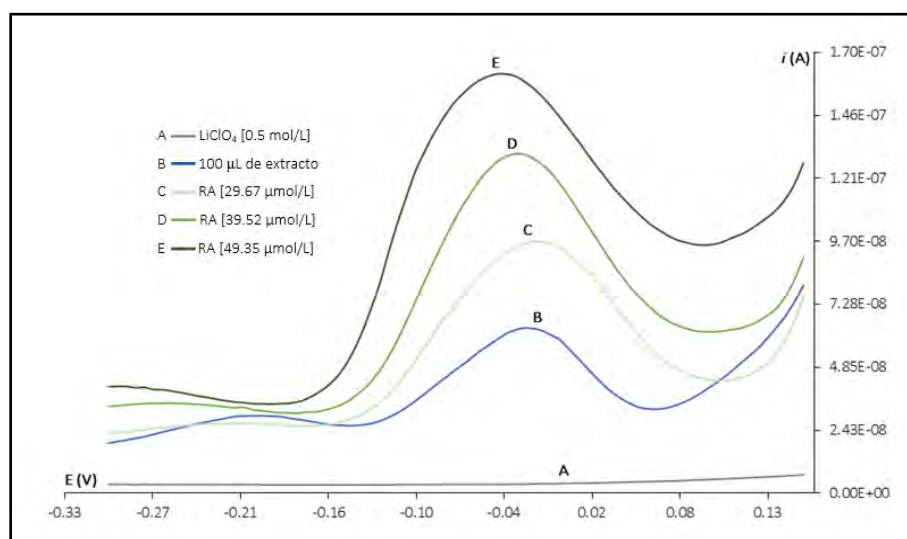


Gráfica 32. Curva de corriente de pico i_p vs. diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua-alcohol, aceite WELEDA; señal de oxidación en el potencial de -0.13 V.

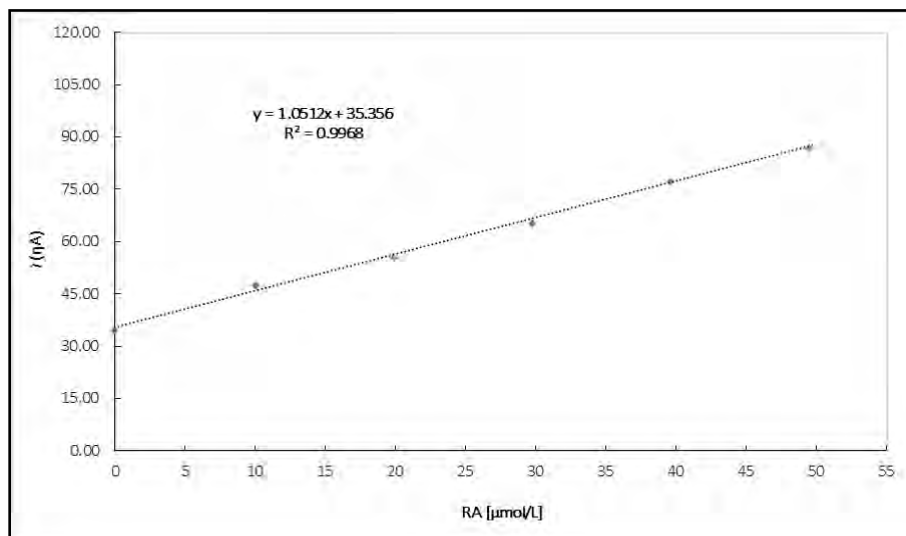
Para cuantificar el ácido rosmarínico en la muestra se tomó el valor de i_p de la muestra problema en el potencial de -0.13 V y se sustituyó en la ecuación de la recta, de tal forma que se obtuvo una concentración de 3.35×10^{-3} mol/L o 1207 mg/L de ácido rosmarínico en el aceite.

5.7.5 Extracción Soxhlet

Con la extracción Soxhlet se obtuvieron 200.0 mL de extracto de romero en etanol-agua (90:10 v/v). La metodología empleada para la cuantificación del compuesto fue la misma utilizada en el estudio de los extractos comerciales, se colocaron 20.0 mL de LiClO_4 0.5 mol/L en agua, se burbujeó nitrógeno por 10 minutos para eliminar el oxígeno disuelto y se trazaron las curvas de i/E correspondientes en polarografía clásica y polarografía diferencial de impulsos del electrolito soporte. Se tomaron alícuotas de 20.0, 30.0 y 50.0 μL del extracto de romero; después de las adiciones del extracto, se realizaron 5 adiciones de 20.0 μL de disolución patrón de ácido rosmarínico, se burbujeó nitrógeno por 30 segundos entre cada adición y se trazó la curva de i/E correspondiente a cada adición con la técnica diferencial de impulsos. En este estudio se observaron las señales características de ácido rosmarínico (una oxidación y dos reducciones), además de otras señales que son atribuidas a otros compuestos que contiene el romero, al igual que con los productos comerciales, se utilizó la señal de oxidación para la cuantificación del ácido.



Gráfica 33. Curvas i/E de extracto de romero y de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L]; polarogramas obtenidos con la técnica diferencial de impulsos en el intervalo de -0.33 a 0.15 V.



Gráfica 34. Curva de corriente de pico i_p vs. diferentes concentraciones de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua, extracto de romero; señal de oxidación en el potencial de -0.03 V.

Para la cuantificación el compuesto en el extracto de romero obtenido mediante la extracción Soxhlet se tomó el valor de i_p de la muestra problema en el potencial de -0.03 V y se sustituyó en la ecuación de la recta, se obtuvo una concentración de 6.76×10^{-3} mol/L o 2435 mg/L de ácido rosmarínico.

Producto	Concentración de ácido rosmarínico en el producto	
Naturland	No se identificó el compuesto	
Attar	$1.47 \times 10^{-2} \pm 6.35 \times 10^{-4}$ mol/L	5325 ± 213 mg/L
WALA	$1.66 \times 10^{-3} \pm 5.55 \times 10^{-5}$ mol/L	596 ± 18 mg/L
WELEDA	$3.04 \times 10^{-3} \pm 7.25 \times 10^{-5}$ mol/L	1095 ± 22 mg/L
Extracto de romero	$6.76 \times 10^{-3} \pm 5.01 \times 10^{-4}$ mol/L	2435 ± 170 mg/L

Tabla 8. Cuadro comparativo de las concentraciones de ácido rosmarínico obtenidas en cada producto analizado.

El contenido de ácido rosmarínico en los aceites WALA y WELEDA corresponde al 10 % de acuerdo a la indicación del fabricante, por lo tanto, es posible suponer que los aceites esenciales a partir de los cuales fueron preparados contenían 10 veces más compuesto.

6. CONCLUSIONES

- Se desarrolló y aplicó un método electroquímico que permite cuantificar ácido rosmarínico de forma sencilla, rápida y económica; se obtuvo el valor del pK_{a1} del ácido en medio acuoso, que es de 3.1.
- El estudio electroquímico muestra que el ácido rosmarínico presenta tres señales características, una oxidación en el potencial de -0.06 V con LDD de 0.80 mg/L y LDC de 2.66 mg/L, y dos reducciones, una en -0.36 V con LDD de 0.35 mg/L y LDC de 1.16 mg/L y otra en el potencial de -1.68 V, esta última característica de la reducción del protón en medio acuoso, con LDD de 58.04 mg/L y LDC de 193.48 mg/L.
- Se estudió el proceso de formación de complejos entre el ácido rosmarínico y los cationes Cu(II) y Hg(II). Dentro del estudio se determinaron estequiometrías y constantes de formación (β_i); para Cu(II) ($\beta_{CuRA}: 10^{4.04}$, $\beta_{CuRA_2}: 10^{7.11}$), y para Hg(II) ($\beta_{HgRA}: 10^{6.08}$, $\beta_{HgRA_2}: 10^{10.81}$).
- Se realizó la cuantificación del ácido rosmarínico en diferentes productos naturales, en el destilado marca Naturland no se identificó ninguna señal característica del compuesto, lo que indica que el destilado no contiene ácido rosmarínico o en su defecto contiene menos de lo que el límite de detección del método permite identificar; por otro lado, en el destilado marca Attar se determinó una concentración de ácido rosmarínico de 5325 mg/L; en los aceites marca WALA y WELEDA se determinó una concentración de 596 mg/L y 1095 mg/L del compuesto respectivamente, y por último, para el extracto de romero obtenido mediante extracción Soxhlet se logró determinar una concentración 2435 mg/L del ácido.

- Considerando que el contenido de ácido rosmarínico en los aceites WALA y WELEDA corresponde al 10 % de acuerdo a la indicación del fabricante, es posible suponer que los aceites esenciales a partir de los cuales fueron preparados originalmente contenían 10 veces más compuesto, es decir, 5960 mg/L en WALA y 10950 mg/L en WELEDA. En comparación con la concentración en el destilado marca Attar (5325 mg/L), se puede concluir que los destilados originales utilizados para preparar los aceites son de mejor calidad que el destilado marca Attar.

- La extracción Soxhlet es útil para extraer el ácido rosmarínico contenido en el romero, sin embargo, es necesario utilizar una misma matriz para comparar su eficiencia con respecto a otras técnicas de extracción (por arrastre de vapor por ejemplo), en caso de ser necesario.

- El aporte global de este estudio está dado por la identificación y cuantificación del ácido rosmarínico en diversos productos naturales; queda demostrado que la propuesta metodológica para el análisis del ácido rosmarínico es funcional y puede llegar a ser de gran utilidad, ya que la capacidad antioxidante del producto (destilado o aceite) depende en gran medida de la cantidad de este compuesto, lo cual puede ser considerado como un parámetro de calidad en este tipo de productos.

7. PERSPECTIVAS

- Es posible ampliar el estudio del ácido rosmarínico si así se desea, una forma de hacerlo es ahondar la investigación sobre los valores de pKa; el medio acuoso sólo permite observar dos puntos de equivalencia, el primero, correspondiente a la desprotonación del grupo carboxilo, y el segundo, relacionado con una desprotonación simultánea, posiblemente de dos fenoles; sería interesante realizar el estudio en otro medio en el que el compuesto sea soluble, por ejemplo, DMSO.
- Otra forma de cuantificar el ácido rosmarínico es realizar valoraciones complejométricas con otros cationes metálicos, pudiendo llegar a observar algún compuesto estable con una elevada capacidad antioxidante.
- Es posible realizar la comparación entre las distintas técnicas de extracción conocidas o más utilizadas en la actualidad, por ejemplo, la extracción vía Soxhlet y la extracción por arrastre de vapor, asimismo, sería interesante realizar una comparación contra otras técnicas analíticas que no impliquen electrólisis, con la finalidad de comparar los límites de detección y de cuantificación posibles para este compuesto.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Musa, O. M., & Chalchat, J. C. (2008). Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 59(7), 691-698.
- [2] Rivera Nuñez, D. y Obón, C., (1995), *Las plantas, las esencias y los perfumes. Introducción al conocimiento de sus tradiciones, cultivo y aprovechamiento en Murcia*, Murcia, España: Ayuntamiento de Murcia.
- [3] López Piñero, J. M. y Costa Taléns, M., (1996), *Las plantas del mundo en la historia. Ilustraciones botánicas de cinco siglos*, Valencia, España: Fundación Bancaja.
- [4] Boelens, H. M. (1985). The Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* L. *Perfumer flavorist*, 10(5), 21-36.
- [5] Lawless, J., (1988), *Guía familiar de aceites esenciales*, Madrid, España: Editorial Susaeta.
- [6] Sotelo, J. I., Martínez-Fong, D., & Marriel, P. (2002). Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the allevation of carbon tetrachloride-induced acute hepatocytotoxicity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(3), 145-154.
- [7] Bissett, N. G., (1994), *Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis*, Londres, Inglaterra: Medpharm.
- [8] Martínez, M. S., Naranjo, L. P., & José, N.R. (2004). Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L. en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(1), 1-6.
- [9] Lozoya, X., (1986), *La Herbolaria Medicinal de México. La Medicina Invisible. Introducción al Estudio de la Medicina Tradicional de México*, México D. F., México: Folios ediciones.
- [10] Bruneton, J. (1995). Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. *Lavoisier Publishing*, 15(220), 405-426.
- [11] Barni, M. V., Fantanals, A., & Moreno, S. (2009). Estudio de la eficacia antibiótica de un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. contra *Staphylococcus aureus* en dos modelos de infección en piel de ratón. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, Sociedad Latinoamericana de Fotoquímica*, 8(3), 219-233.

- [12] Khorshidi, J., Rahmat, M., Mohamed, F. T., & Himan, N. (2009). Influence of drying methods, extraction time, and organ type on essential oil content of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Natural Science*, 7(11), 42-44.
- [13] Morales, R., (2014), *Flora Ibérica. Plantas vasculares de la península ibérica e islas Baleares*, Madrid, España: Editorial CSIC.
- [14] Sánchez, M. G. (2000). *Estudio químico, botánico y actividad antibacteriana de dos cultivares de Rosmarinus officinalis* L. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, UNAM, México D. F.
- [15] Zarucchi, J. (1986). *Rosmarinus officinalis* L. [Imagen]. Recuperado de <http://mobot.mobot.org/Pick/Search/image/imagefr.html>
- [16] Soriano Cano, M. C., Sotomayor Sánchez, J. A., Sánchez Gómez, P., & García Vallejo, M. C. (1993). Essential Oils of the *Rosmarinus eriocalyx-tomentosus*. Complex in Southeast Spain. *J. Essent Res*, 5(243), 246.
- [17] Tucker, A. O., & Maciarello, M. J. (1986). The Essential Oils of Some Rosemary Cultivars. *Flavour and Fregance J.*, 70(3), 137-142.
- [18] Chalchat, J. C., Garry, R. PH., & Michet, A. (1993). Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The Chemical Composition of oils of Various Originis (Morocco, Spain, France). *J. Essent. Oil Res*, 5(6), 613-618.
- [19] Boelens, H. M. (1985). The Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* L. *Perfumer flavorist*, 10(5), 21-36.
- [20] Peyman, S., & Reza, F. A. (2007). Rapid essential oil screening of *Rosmarinus officinalis* L. by hydrodistillationhead space solvent microextraction. *Journal of Flavour and Fragance*, 10(5), 1002-1007.
- [21] Arévalo, Y., Robledo, S., & Muñoz, L. (2009). Evaluación in vitro de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 38(2), 131-141.
- [22] Djeddi, A., Bauchenah, N., & Settar, I. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algerian. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(4), 487-490.

- [23] Bhatt, R., Mishra, N., & Kumar, B. P. (2013). Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 2(2), 28-34.
- [24] The global herbs and Botanicals Market. Gruenwald, S. (2010), [Fecha de consulta: octubre de 2017]
- [25] Palacio García Nieto, L. (2000). Las plantas medicinales y aromáticas. Una alternativa de futuro para el desarrollo rural. *Boletín económico del ICE*, 2652, 29-40.
- [26] Muñoz Centeno, L. M. (2002). Plantas medicinales españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (Romero). *Ediciones Universidad de Salamanca*, 21(1), 105-118.
- [27] Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Río, J. A., Ortuño, A., Quirin, K. W., & Gerard, D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4247-4253.
- [28] Base de datos de la FAO (2015), [Fecha de consulta: octubre de 2017], <http://www.fao.org>
- [29] Parnham, M.J., & Kesselring, K. (1985). Rosmarinic acid. *Drugs of the Future* 10(9), 756–757.
- [30] Budantsev, A. L., & Lesiovskaya, E. E. (2012). Rosmarinic acid: resources and biological activity. *Plant resources*, 48(3), 453-468.
- [31] Sardans, J., Roda, F., & Peñuelas, J. (2005). Effects of water and nutrient pulse supply on *Rosmarinus officinalis* growth, nutrient content and flowering in the field. *Environmental and Experimental Botany*, 53(1), 1-11.
- [32] Cheng, X., Liang-wu, B., Zhen-dong, Z., & Tian-juan, X. (2015). Research progress on extraction, purification and biological activities of rosmarinic acid. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 35(4), 151-158.
- [33] Scarpati, M.L., Oriente, G., (1958). Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus off.*). *Ric. Sci.*, 28, 2329-2333.
- [34] Gao, Y. Y. (2015). Über Rosmarin und Rosmarinsäure. Mittel gegen die Pest und mediterranes Gewürz. *Chemie in unserer Zeit*, 49(5), 302-311.

- [35] Martínez Domínguez, M., (1993), *Guía para el aprovechamiento del orégano Lippia berlandieri Schauer, en la zona norte de Jalisco*, Guadalajara, México: Revista Mexicana de Ciencias Forestales.
- [36] Gudzenko, A. (2013). Development and validation of a method for the determination of rosmarinic acid in *Mentha piperita* L. using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(9), 40-45.
- [37] Ming, L., Jianguang, L., Dongdong W., Wenhuan, D., & Xiaoying, Z. (2015). Determination of rosmarinic acid content in *Origanum vulgare* L. by HPLC. *Department of Pharmacy, the Sixth Affiliated Hospital Xinjiang Medical University Urumqi, Xinjiang*, 37, 857-859.
- [38] Ellis, B.E., & Towers, G. H. N. (1970). Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem. J.*, 118(2), 291-297.
- [39] Peterson, M., & Simmonds, M. S. J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121-125.
- [40] Eicher, T., Ott, M., & Speicher, A. (1996). Bryophyte Constituents: New Synthesis of (+)-Rosmarinic Acid and Related Compunds. *Thieme Synthesis*, 6, 755-762.
- [41] Häusler, E., Petersen, M., & Alfermann, A. W. (1992), *Rosmarinsäure in Blechnum-Spezies*, Berlín, Alemania: Haschke, H. P.
- [42] Ravn, H., Pedersen, M. F., Andary, J., Borum, C., Anthoni, U., Christophersen, C., & Nielsen, P. H. (1994). Seasonal variation and distribution of two phenolic compounds, rosmarinic acid and caffeic acid, in leaves and roots-rhizomes of eelgrass (*Zostera marina* L.). *Journal Ophelia*, 40(1), 51-61.
- [43] Hiller, K. (1965). Isolierung und quantitative Erfassung von Chlorogen-und Rosmarinsäure. *Pharmazie* 20, 574-579.
- [44] Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S., (2005), *Voltametría. Fundamentos de Química Analítica*, México D. F., México: Editorial Thomson.
- [45] Harris, D. C., (2005), *Análisis químico cuantitativo*, México D. F., México: Editorial Reverté S.A.

[46] Bard, A. J., & Faulkner, L. R., (2001), *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, New York, USA: Editorial John Wiley & Sons, Inc.

9. ANEXOS

9.1 Estudio logarítmico de las curvas i/E para la determinación del potencial de media onda ($E_{1/2}$)

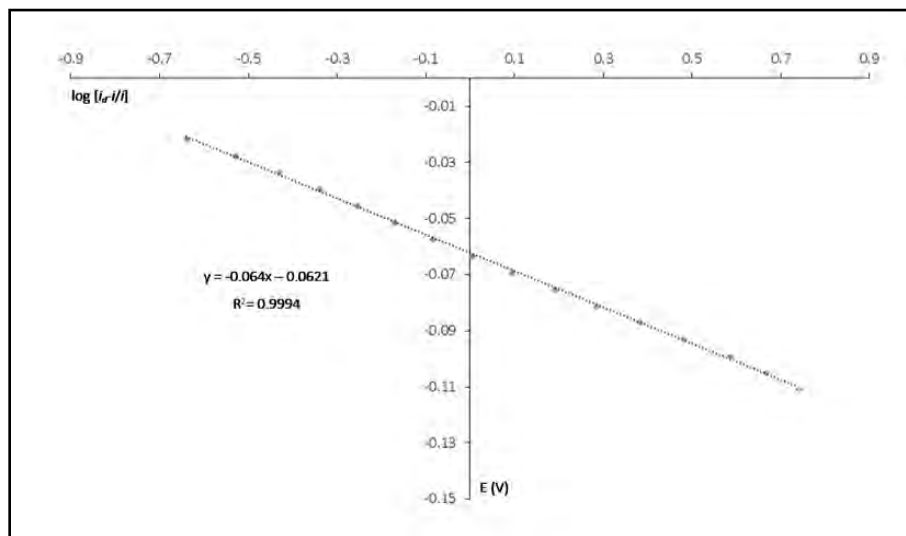
Las ondas o señales polarográficas de oxidación de un reductor, tienen un comportamiento expresado por la siguiente ecuación (a 25°C):

$$E = E_{1/2} + \frac{0.059}{n} \log \left[\frac{i_{red} - i}{i} \right]$$

Por lo tanto, una gráfica de potencial (E) vs. $\log [(i_d - i)/-i]$ es una línea recta cuya ordenada al origen corresponde al potencial de media onda ($E_{1/2}$) y la pendiente involucra el número de electrones intercambiados (n). El potencial de media onda es característico para cada sistema redox en un medio determinado, es independiente de la concentración de la especie electroactiva y además corresponde al potencial en que la corriente es igual a la mitad de la corriente límite ($i = i_d/2$). Para llevar a cabo este estudio se utilizaron datos de las curvas i/E obtenidas por polarografía clásica en el medio de LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua a una concentración de 9.87×10^{-5} mol/L de ácido rosmarínico en la celda. Los valores para calcular el $\log [(i_d - i)/-i]$ se tomaron de la zona logarítmica de la curva. Como ejemplo, se muestra el procedimiento para el estudio logarítmico del ácido rosmarínico, a partir del cual se obtuvieron los datos de la siguiente tabla, representados en la gráfica 35:

$i_{\text{Corregida}} \text{ (nA)}^*$	$\log [(i_d - i)/-i]$	$E \text{ (V)}$
92.6	-0.528	-0.027
87.5	-0.430	-0.033
82.4	-0.341	-0.039
77.2	-0.255	-0.045
71.7	-0.171	-0.051
65.9	-0.085	-0.057
59.8	0.002	-0.063
53.6	0.092	-0.068
47.2	0.187	-0.074
41.1	0.283	-0.080
35.2	0.382	-0.086
29.8	0.480	-0.092
24.8	0.585	-0.098
21.3	0.666	-0.104

Tabla 9. Valores experimentales para el análisis logarítmico.



Gráfica. 35. Análisis logarítmico de la señal de oxidación en -0.06 V del ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L] en agua.

9.2 Gráfico de Tafel

El gráfico de Tafel es una representación de la ecuación de Tafel, es decir que es un gráfico de $\log i$ en función de η :

$$\log i = \log i_0 + \frac{anF}{2.3RT} * \eta$$

Donde η es el sobrepotencial ($\eta = E - E_{\text{eq}}$), i es la corriente e i_0 es la corriente de intercambio, que representa la corriente que se transfiere al potencial de equilibrio (E_{eq}). Sin embargo, comúnmente se desconoce el potencial normal condicional (E°) del sistema en estudio y los datos de sobrepotencial se sustituyen por los valores de potencial (E) de la curva i/E , pues se considera que i tiende a cero y $\log i$ a menos infinito cuando E se acerca a E° .

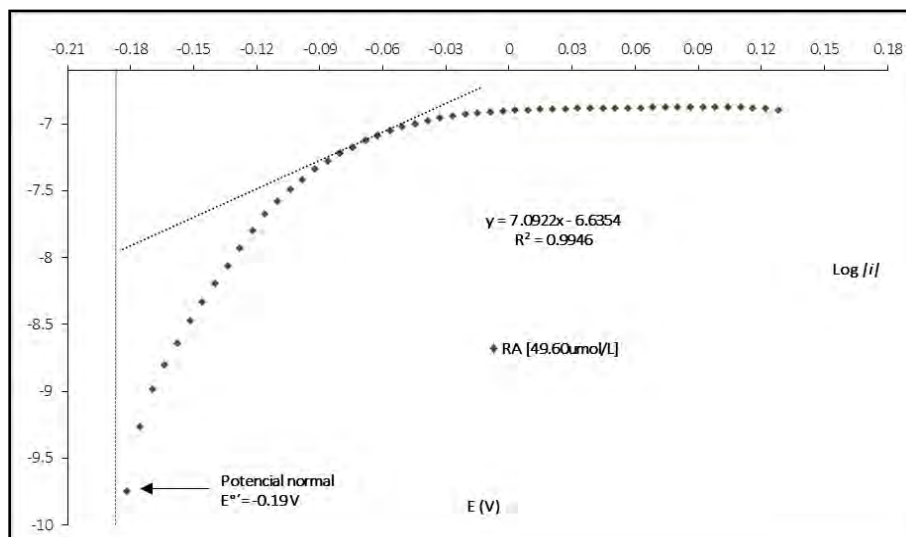
Gráfico de Tafel para la señal de oxidación de ácido rosmarínico en -0.06 V

Como ejemplo, en la siguiente tabla se muestra el tratamiento realizado para la señal de oxidación a una concentración de 4.96×10^{-5} mol/L de ácido rosmarínico en celda.

Tabla 10. Valores experimentales para la gráfica de Tafel.

E (V)	<i>i</i> (A)	log <i>i</i>
0.127	1.30E-07	-6.8874788
0.121	1.33E-07	-6.8771585
0.115	1.34E-07	-6.8723899
0.109	1.35E-07	-6.8692193
0.103	1.36E-07	-6.8676635
0.097	1.36E-07	-6.8676538
0.091	1.36E-07	-6.8674682
0.085	1.36E-07	-6.8678748
0.079	1.35E-07	-6.8684519
0.073	1.35E-07	-6.8689366
0.067	1.35E-07	-6.869618
0.061	1.35E-07	-6.8708227
0.056	1.34E-07	-6.8714812
0.050	1.34E-07	-6.8723996
0.044	1.34E-07	-6.8730929
0.038	1.34E-07	-6.8742781
0.032	1.33E-07	-6.8759557
0.026	1.32E-07	-6.8778398
0.020	1.32E-07	-6.8789591
0.014	1.31E-07	-6.8816757
0.008	1.30E-07	-6.8851089
0.002	1.29E-07	-6.8892016
-0.003	1.28E-07	-6.8941459
-0.009	1.26E-07	-6.900879
-0.015	1.23E-07	-6.9091567
-0.021	1.20E-07	-6.9194998
-0.027	1.17E-07	-6.932349
-0.033	1.13E-07	-6.9478218
-0.039	1.08E-07	-6.9665481
-0.045	1.03E-07	-6.9885691
-0.051	9.66E-08	-7.0149465
-0.057	9.01E-08	-7.0451981
-0.063	8.31E-08	-7.0802213
-0.068	7.61E-08	-7.1187923
-0.074	6.85E-08	-7.1643728
-0.080	6.11E-08	-7.2141507
-0.086	5.39E-08	-7.2685885
-0.092	4.66E-08	-7.3314184
-0.098	3.92E-08	-7.4065256
-0.104	3.28E-08	-7.4846163
-0.110	2.68E-08	-7.5724652
-0.116	2.15E-08	-7.6682084
-0.122	1.63E-08	-7.7882122
-0.128	1.20E-08	-7.9214344
-0.134	8.81E-09	-8.0552213
-0.140	6.53E-09	-8.1849538
-0.146	4.75E-09	-8.3233064
-0.152	3.42E-09	-8.4659739
-0.158	2.35E-09	-8.6294869
-0.164	1.61E-09	-8.794525

Con los datos de la tabla anterior se trazó la gráfica de $\log i$ en función de E , que se representa a continuación.



Gráfica. 36. Gráfico de Tafel de la señal de oxidación en -0.06 V del ácido rosmarínico en LiClO_4 $[0.5 \text{ mol/L}]$.

En la gráfica anterior el valor de la pendiente de la recta (m) corresponde a $\alpha nF/2.3RT$, de tal forma que despejando se obtiene un valor de αn :

$$\alpha n = \frac{2.3RT}{F} * m = 2.3 * (0.02569 \text{ V}) * (7.0922 \text{ V}^{-1}) = 0.419$$

Además, en la gráfica se observa que para un potencial de -0.19 V el valor de $\log i$ tiende a menos infinito, es decir, que -0.19 V corresponde al valor de potencial normal condicional del sistema y por lo tanto el valor de $\log i$ dado por la ecuación anterior a dicho potencial puede considerarse como la corriente de intercambio o $\log i_0$, considerando esto se tiene:

$$\log i = 7.0922E - 6.6354 \text{ ó } \log i_0 = [7.0922 \text{ V}^{-1} * (-0.19\text{V})] - 6.6354 = -7.977$$

$$\text{Como } \log i_0 = -7.977 \text{ se tiene que } i_0 = 1.05 \times 10^{-8} \text{ A}$$

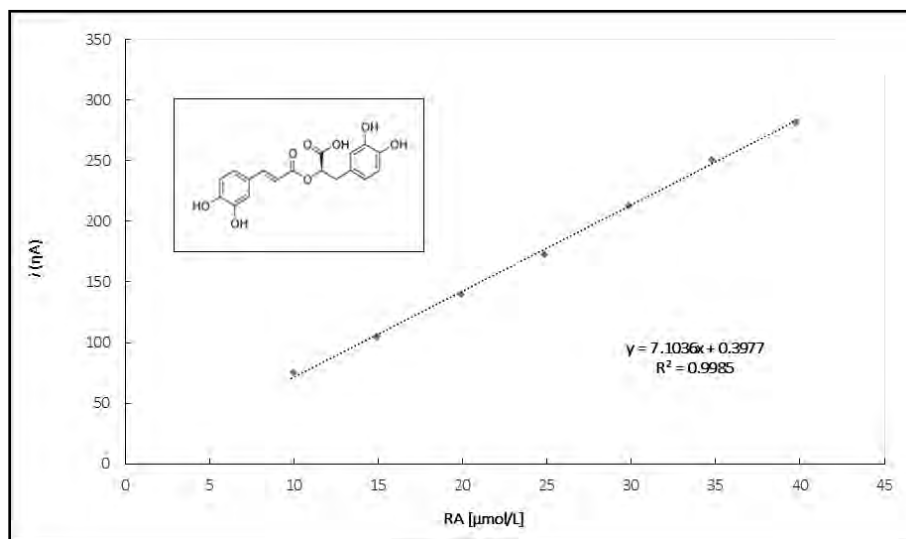
Este valor de i_0 corresponde a un sistema electroquímicamente lento.

9.3 Determinación del límite de detección y linealidad del método

Como ejemplo para los cálculos de linealidad y límite de detección se muestran los resultados obtenidos para la curva de calibración de la señal de oxidación del ácido rosmarínico a un potencial de pico (E_p) de -0.03 V, misma que se obtuvo al graficar la corriente de pico de dicha señal (obtenida por polarografía diferencial de impulsos) contra su respectiva concentración de ácido rosmarínico en la celda; al realizar adiciones comprendidas entre 9.96×10^{-6} mol/L y 3.97×10^{-5} mol/L en un medio de LiClO_4 0.5 mol/L en agua.

Volumen de ácido rosmarínico (μL)	[Ácido rosmarínico] _{Celda}	i_p (nA)
0	0.00E+00	0
20	9.96E-06	35.1
30	1.49E-05	64.6
40	1.99E-05	99.9
50	2.49E-05	133
60	2.98E-05	173
70	3.48E-05	211
80	3.97E-05	242

Tabla 11. Valores de intensidad de corriente de la señal de oxidación del ácido rosmarínico en -0.03 V.



Gráfica 37. Curva de calibración para la señal de oxidación en -0.03 V ($E_p = -0.06$ V) de ácido rosmarínico en LiClO_4 [0.5 mol/L].

A partir de la curva de calibración obtenemos la ecuación de la recta que corresponde a la regresión lineal de los puntos graficados. La linealidad del método está relacionada con el coeficiente de R^2 , de tal forma que se tiene:

$$\begin{aligned} y &= 7.1036x - 39.602 \\ R^2 &= 0.9985 \\ n &= 7 \end{aligned}$$

donde “y” es la intensidad de corriente experimental (i_{exp}), “x” es la concentración de ácido rosmarínico en la celda, R^2 es el coeficiente de correlación de la recta, y “n” número de datos experimentales. De tal forma, la curva presenta un coeficiente de correlación muy cercano a la unidad, lo cual indica que la corriente es directamente proporcional a la concentración, es decir que esta señal de oxidación se encuentra regulada por la difusión convectiva, lo que permite su aplicación con fines cuantitativos.

Para calcular el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} S_{i/c} &= \{[\Sigma(i_{exp} - i_{cal})^2] / (n-2)\}^{1/2} \\ i_{cal} &= (C_{exp} * m) + b \\ LDD &= 3S_{i/c}/m \\ LDC &= 10S_{i/c}/m \end{aligned}$$

donde, $S_{i/c}$ es la desviación estándar de la recta, i_{exp} es la intensidad de corriente experimental, C_{exp} es la concentración del ácido rosmarínico en la celda, “m” es la pendiente de la ecuación de linealidad y “b” es la ordenada de la ecuación de linealidad.

Los resultados que se obtienen al aplicar las ecuaciones anteriores se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 12. Valores para el cálculo del límite de detección.

C_{Exp} ($\mu\text{mol/L}$)	i_{Exp} (nA)	i_{Cal} (nA)	$(i_{Exp}-i_{Cal})^2$	$S_{i/c}$	LDD	LDC
					mol/L	mol/L
9.96	35.1	31.15	15.60	5.24	2.21E-06	7.38E-07
14.90	64.6	66.47	3.51		mg/L	mg/L
19.90	99.9	101.76	3.46		0.80	2.66
24.86	133	137.01	16.11			
29.82	173	172.23	0.59			
34.77	211	207.41	12.86			
39.72	242	242.56	0.31			

Para obtener LDD y LDC en términos de partes por millón (1 ppm = mg/L) se multiplica por la masa molar del ácido rosmarínico (360.31 g/mol) y luego por (1000 mg/1g).

Al aplicar esta metodología se obtienen para la señal de reducción en -0.36 V los siguientes datos:

Ecuación de la recta: $y = 0.1012x - 0.2357$

Linealidad del método: $R^2 = 0.9963$

LDD: 9.70E-07 mol/L ó 0.35 mg/L

LDC: 3.23e-06 mol/L ó 1.16 mg/L

La señal de reducción en -1.68 V fue analizada de la misma forma, los datos obtenidos se resumen en la siguiente tabla.

$E_{1/2}$ (V)	E_p (V)	Reacción	LDD (mg/L)	LDC (mg/L)
-0.06	-0.03	Oxidación	0.80	2.66
-0.36	-0.33	Reducción	0.35	1.16
-1.68	-1.71	Reducción	58.04	193.48

Tabla 13. Cuadro comparativo de los límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC) de las señales características del ácido rosmarínico.

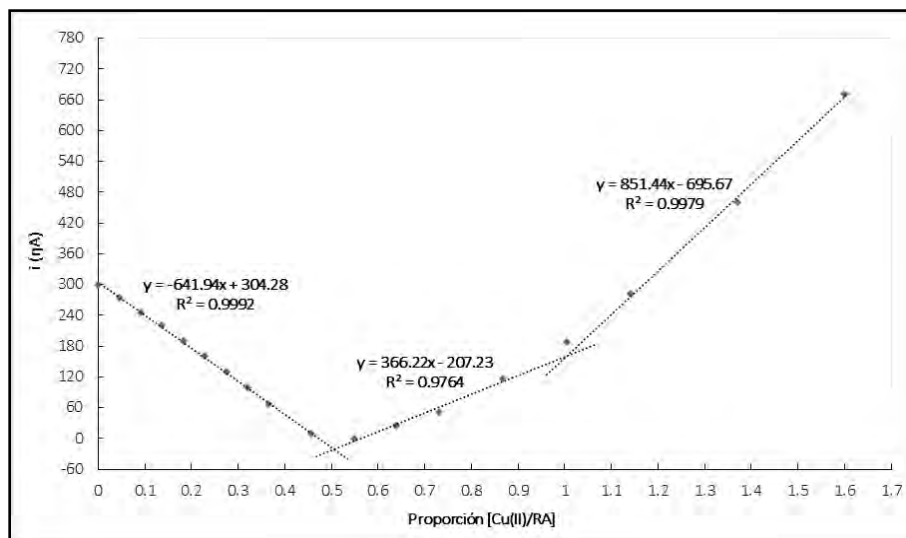
9.4 Determinación de las constantes de formación de complejos

Las estequiometrías y constantes de formación determinadas en este trabajo se obtuvieron a partir del análisis cualitativo y cuantitativo de las curvas $i_p=f$ (mol catión agregado/mol ácido rosmarínico). A manera de ejemplo se muestra la obtención de dichos valores para el caso del complejo Cu(RA)_2 .

En primer lugar, se obtiene el gráfico de relaciones molares $i_p^{-0.03V}=f(\text{relación molar})$, el cual es una representación gráfica del valor de la corriente de pico a -0.03 V , que es proporcional a la concentración de ácido rosmarínico en la celda, contra el valor de la relación molar catión/ácido rosmarínico, que es una forma distinta de representar la cantidad de iones Cu(II) añadidos a la celda, pero que permite leer directamente sobre los valores en el eje x la estequiometría de los complejos formados cuando cambia la pendiente de la curva. Para la valoración complejométrica de ácido rosmarínico en la celda (concentración inicial de $7.91 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$; vol. 20.16 mL ; $1.59 \times 10^{-6}\text{ moles}$) con Cu(II) 0.00731 mol/L se obtuvieron los siguientes datos.

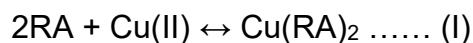
Tabla 14. Conjunto de datos experimentales obtenidos para la curva de valoración complejométrica de $1.59\text{ }\mu\text{mol}$ de ácido rosmarínico con Cu(II) .

Volumen añadido de Cu(II) (μL)	μmoles de Cu(II) añadidos	Fración molar $[\text{Cu(II)/RA}]$	$i_p^{-0.03V}$ (ηA)
0	0.000	0	300
10	0.073	0.045	274
20	0.146	0.091	245
30	0.219	0.137	220
40	0.292	0.182	190
50	0.366	0.228	160
60	0.439	0.274	130
70	0.512	0.319	98.9
80	0.585	0.365	66.7
100	0.731	0.456	9.13
120	0.877	0.548	0
140	1.023	0.639	23.6
160	1.170	0.731	51.1
190	1.389	0.868	117
220	1.608	1.005	188
250	1.828	1.142	282
300	2.193	1.370	461
350	2.559	1.599	671
400	2.924	1.827	898



Gráfica 38. Curva de corriente de pico (i_p) en -0.06 V ($E_{1/2} = -0.03\text{ V}$) vs. relación molar $[\text{Cu(II)}/\text{RA}]$; 1.59×10^{-6} mol de ácido rosmarínico en agua.

En la curva de la gráfica 38 se observan 2 puntos de intersección o cambios de pendiente, en $x=0.5$ y $x=1$, lo que indica la formación de los complejos $\text{Cu}(\text{RA})_2$ y CuRA , esto quiere decir que durante la valoración se llevan a cabo los siguientes equilibrios:



Ahora bien, como la señal en -0.03 V es de difusión convectiva, se puede relacionar directamente su valor respectivo de corriente de pico (i_p) con la concentración de ácido rosmarínico (C_{RA}) presente en su forma libre, es decir, no complejada. Entonces, si al inicio ($x=0$) se tiene un valor de $i_p = 300\ \mu\text{A}$ para $C_{\text{RA}} = 7.91 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$, se calcula la concentración de todas las especies al equilibrio de la siguiente forma.

Para el complejo 1:1

$$C_{\text{RA}} = (188\ \mu\text{A} / 300\ \mu\text{A}) * 7.91 \times 10^{-5}\text{ mol/L} = 4.95 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$$

Corrigiendo por el factor de dilución se tiene:

$$C_{\text{RA}} = 4.95 \times 10^{-5}\text{ mol/L} * (20.38\text{mL} / 20.16\text{mL}) = 5.01 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$$

Esta es la concentración de ácido rosmarínico libre en la celda cuando se alcanza una estequiometría 1:1, y como además se conocen tanto la concentración inicial de ácido, la de cobre agregada, se puede escribir el siguiente cuadro de balance de masa:

	Cu(II)	+	RA	↔	CuRA
Inicio	220 μL * 0.00731 mol/L = 1.61x10 ⁻⁶ mol		20.16 mL * 7.91x10 ⁻⁵ mol/L = 1.59x10⁻⁶ mol		0
Reacciona					
Equilibrio			20.38 mL * 5.01x10 ⁻⁵ mol/L = 1.02x10⁻⁶ mol		

Tabla 15. Cuadro de balance de masa para la valoración complejométrica de ácido rosmarínico con Cu(II).

A partir de los datos anteriores, se puede conocer la cantidad de moles de ácido rosmarínico que reaccionaron con Cu(II), que es:

$$n_{\text{RA}}^{\text{Reacción}} = n_{\text{RA}}^{\text{Totales}} + n_{\text{RA}}^{\text{Equilibrio}} = 1.59 \times 10^{-6} \text{ mol} - 1.02 \times 10^{-6} \text{ mol} = 5.73 \times 10^{-7} \text{ mol}$$

Este dato sirve para inferir la cantidad de Cu(II) que reaccionó, así como la cantidad de complejo formado, pues se conoce la estequiometría de la reacción:

$$5.73 \times 10^{-7} \text{ mol RA} * (1 \text{ mol Cu(II)} / 1 \text{ mol RA}) = 5.73 \times 10^{-7} \text{ mol CuRA}$$

además:

$$n_{\text{Cu(II)}}^{\text{Equilibrio}} = n_{\text{Cu(II)}}^{\text{Total}} - n_{\text{Cu(II)}}^{\text{Reacción}} = 1.61 \times 10^{-6} \text{ mol} - 5.73 \times 10^{-7} \text{ mol}$$

$$n_{\text{Cu(II)}}^{\text{Equilibrio}} = 1.04 \times 10^{-6} \text{ mol Cu(II)}$$

Al calcular estos valores se puede determinar la concentración de todas las especies al equilibrio en el primer punto de equivalencia, donde el volumen total en la celda es de 20.27 mL, los cálculos anteriores se resumen en la siguiente tabla:

	Cu(II)	+	RA	↔	CuRA
Inicio	220 μ L*0.00731 mol/L= 1.61x10 ⁻⁶ mol		20.16 mL*7.91x10 ⁻⁵ mol/L= 1.59x10 ⁻⁶ mol		0
Reacciona	5.73x10 ⁻⁷ mol		5.73x10 ⁻⁷ mol		
Equilibrio	1.04x10 ⁻⁷ mol /20.38 mL= 5.10x10⁻⁵ mol/L		20.38 mL* 5.01x10⁻⁵ mol/L = 1.02x10 ⁻⁶ mol		5.73x10 ⁻⁷ mol /20.38 mL= 2.81x10⁻⁵ mol /L

Tabla 16. Cuadro de balance de masa completo para la valoración complejométrica de ácido rosmarínico con Cu(II).

Basta sustituir los valores de concentración al equilibrio anteriores en la expresión de la constante de equilibrio para determinar su valor:

Equilibrio: $\text{Cu(II)} + \text{RA} \leftrightarrow \text{CuRA}$

Constante de equilibrio: $k_1 = \beta_1 = \frac{[\text{Cu RA}]}{[\text{Cu(II)}][\text{RA}]}$

$$\beta_1 = [2.81 \times 10^{-5} \text{ mol /L}] / [(5.10 \times 10^{-5} \text{ mol/L}) (5.01 \times 10^{-5} \text{ mol/L})] = 1.09 \times 10^4$$

Esto también se puede escribir como: $\log \beta_1 = 4.04$

Se aplicó el mismo tratamiento de datos para obtener $\beta_2 = 1.28 \times 10^7$ o $\log \beta_2 = 7.11$

De la misma forma se realizó el tratamiento para la valoración del ácido rosmarínico con Hg(II), obteniendo $\log \beta_2 = 10.81$ $\log \beta_1 = 6.08$ y para los complejos Hg(RA)₂ y HgRA respectivamente.

Catión	Complejos formados	Logβ_i
Cu ²⁺	CuRA, Cu(RA) ₂	4.04, 7.11
Hg ²⁺	HgRA, Hg(RA) ₂	6.08, 10.81

Tabla 17. Valores de log β_i obtenidos en la complejación de ácido rosmarínico con cationes metálicos.

9.5 Construcción de los diagramas de abundancia relativa de especies

A continuación, se muestra a modo de ejemplo, el procedimiento que se siguió para la construcción del diagrama de abundancia relativa de las especies presentes durante la formación de complejos Cu(II)-RA.

Un diagrama de abundancia relativa de especies es un gráfico de ϕ en función de $\log[p]$ donde ϕ representa la fracción, en términos de concentración, de la especie de interés y $[p]$ la concentración de la partícula intercambiada o en su caso la especie que represente la variable independiente; por ejemplo, ϕ_{RA} se escribiría como:

$$\phi_{RA} = \frac{[RA]}{[RA]_{Total}} = \frac{[RA]}{[RA] + [CuRA] + [CuRA_2]}$$

Si recordamos que los equilibrios que dan lugar a las formas complejadas del RA(II) son los siguientes:



Entonces podemos escribir ϕ_{RA} de la siguiente forma:

$$\phi_{RA} = \frac{[RA]}{[RA]_{Total}} = \frac{[RA]}{[RA] + [CuRA] + [CuRA_2]} = \frac{[RA]}{[RA] + \beta_1 [Cu^{2+}][RA] + \beta_2 [Cu^{2+}][RA]^2}$$

Es decir que ϕ_{RA} es igual a:

$$\phi_{RA} = \frac{1}{1 + \beta_1 [Cu^{2+}] + \beta_2 [Cu^{2+}][RA]}$$

Donde [RA] es constante; siguiendo con el desarrollo algebraico similar se obtienen las siguientes expresiones:

$$\varphi_{\text{CuRA}} = \frac{\beta_1 [\text{Cu}^{2+}]}{1 + \beta_1 [\text{Cu}^{2+}] + \beta_2 [\text{Cu}^{2+}] [\text{RA}]} = \varphi_{\text{RA}} \beta_1 [\text{Cu}^{2+}]$$

$$\varphi_{\text{CuRA}_2} = \frac{\beta_2 [\text{Cu}^{2+}] [\text{RA}]}{1 + \beta_1 [\text{Cu}^{2+}] + \beta_2 [\text{Cu}^{2+}] [\text{RA}]} = \varphi_{\text{RA}} \beta_2 [\text{Cu}^{2+}] [\text{RA}]$$

Según las expresiones anteriores, la abundancia relativa de cada especie depende de la concentración de Cu^{2+} , de la concentración del ácido rosmarínico libre en disolución y de las respectivas constantes globales de formación (β_i); sin embargo, las valoraciones fueron realizadas conociendo [RA] en celda, por lo tanto, los diagramas se pueden construir simplemente al asignar diferentes valores de $[\text{Cu}^{2+}]$ y calcular los respectivos φ_{RA} , φ_{CuRA} y φ_{CuRA_2} . Como ejemplo se muestra la siguiente tabla donde se asignaron valores a pCu^{2+} , que es el $-\log[\text{Cu}^{2+}]$, entre 0 y 10, de donde se obtiene $[\text{Cu}^{2+}]$ y se calculan después los valores de φ .

pCu^{2+}	$[\text{Cu}^{2+}]$	φ_{RA}	φ_{CuRA}	φ_{CuRA_2}
0	1.0000	7.76E-08	0.999149508	0.000850414
0.5	0.3162	7.74E-07	0.997314918	0.002684308
1	0.1000	7.70E-06	0.99155282	0.008439483
1.5	0.0316	7.56E-05	0.973716497	0.026207918
2	0.0100	7.15E-04	0.920903547	0.078381604
2.5	0.0032	6.08E-03	0.7831369	0.210784022
3	0.0010	4.02E-02	0.518467085	0.441287057
3.5	0.0003	1.74E-01	0.223824712	0.602432001
4	0.0001	4.49E-01	0.057890969	0.492732056
4.5	3.16E-05	7.35E-01	0.009475075	0.255024946
5	1.00E-05	9.00E-01	0.001159607	0.098698586
5.5	3.16E-06	9.66E-01	0.000124492	0.033507539
6	1.00E-06	9.89E-01	1.27426E-05	0.010845721
6.5	3.16E-07	9.97E-01	1.2838E-06	0.003455383
7	1.00E-07	9.99E-01	1.28684E-07	0.001095277
7.5	3.16E-08	1.00E+00	1.2878E-08	0.000346617
8	1.00E-08	1.00E+00	1.28811E-09	0.000109636
8.5	3.16E-09	1.00E+00	1.2882E-10	3.46725E-05
9	1.00E-09	1.00E+00	1.28824E-11	1.09647E-05
9.5	3.16E-10	1.00E+00	1.28825E-12	3.46736E-06
10	1.00E-10	1.00E+00	1.28825E-13	1.09648E-06

Tabla 18. Conjunto de valores calculados para construir el diagrama de abundancia relativa para los complejos de Cu(II)-RA.

Con los datos de la tabla 18 es posible obtener de forma directa el diagrama de abundancia relativa al graficar los respectivos valores de ϕ para cada especie vs. pCu^{2+} . Al hacerlo se obtiene el siguiente diagrama:

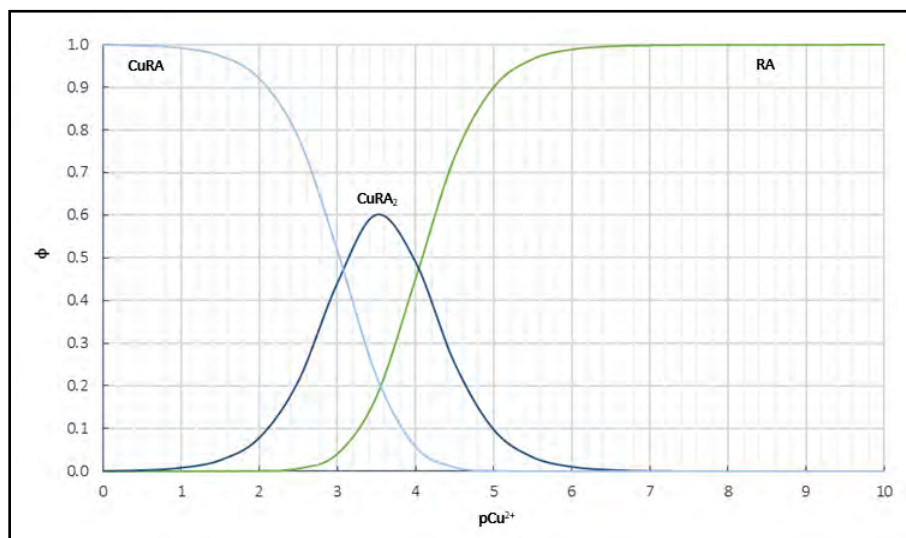
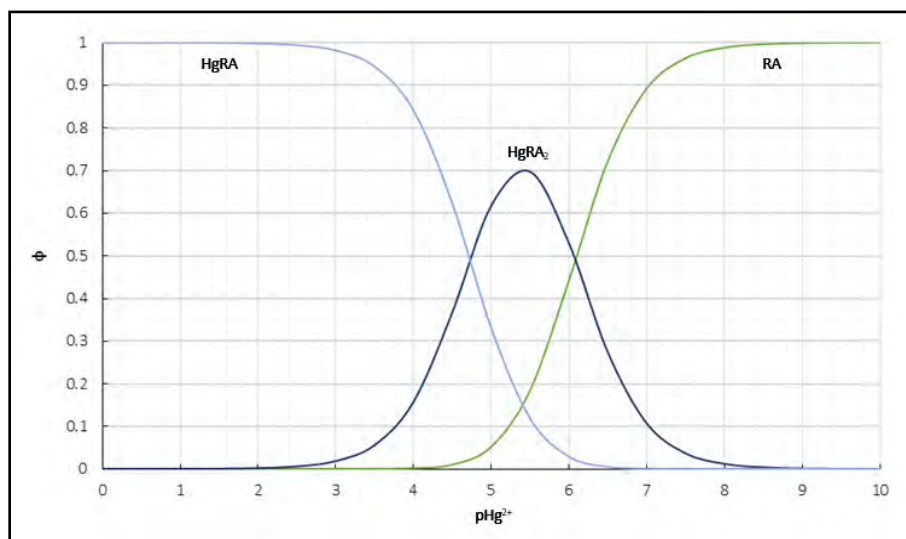


Gráfico 39. Diagrama de abundancia relativa de especies para los complejos de ácido rosmarínico con $Cu(II)$.

Se realizó el mismo tratamiento para trazar el diagrama de abundancia relativa de especies para los complejos de $Hg(II)$ con ácido rosmarínico, el resultado se muestra en la siguiente gráfica.



Gráfica 40. Diagrama de abundancia relativa de especies para los complejos de $Hg(II)$ con ácido rosmarínico.

9.6 Estimación de la incertidumbre asociada al análisis

A continuación, se muestra a modo de ejemplo, la estimación de la incertidumbre en los análisis efectuados. En la siguiente expresión se considera el aporte de las diversas fuentes de incertidumbre asociadas a cada experimento:

$$U_C = [U_A^2 + U_B^2]^{1/2}$$

Donde U_A es la incertidumbre relacionada con el método de cuantificación y puede ser calculado conociendo la desviación estándar y la raíz del número de muestras como se muestra en la siguiente fórmula: $U_A = \sigma / n^{1/2}$

La incertidumbre tipo B puede ser estimada mediante las incertidumbres asociadas a cada una de las muestras:

$$U_B = [U_{\text{Conc.}}^2 + U_{\text{Vol.1}}^2 + U_{\text{Vol.2}}^2 + U_{\text{Masa}}^2]$$

Las fuentes de incertidumbre asociadas a cada determinación del contenido de ácido rosmarínico cuantificado mediante polarografía diferencial de impulsos son: el volumen de muestra, el volumen de aforo en caso de haber diluido y la masa pesada de romero en el caso del extracto. Puesto que el contenido de ácido rosmarínico se determinó mediante la curva de calibración por adiciones estándar, se puede estimar su incertidumbre mediante la ordenada al origen y la pendiente de la recta. $U_{\text{Conc.}} = U_{\text{RA}}$

$$U_{\text{RA}} = RA \left[\left(\frac{U_b}{b} \right)^2 + \left(\frac{U_m}{m} \right)^2 \right]^{1/2}$$

La incertidumbre de la ordenada al origen (U_b) y la incertidumbre de la pendiente de la recta (U_m) pueden obtenerse mediante el error típico que proporciona un análisis de datos en Excel.

La incertidumbre asociada al volumen de muestra (tomada con una pipeta Eppendorf) es de $\pm 0.1 \mu\text{L}$, para la dilución se utilizó una pipeta volumétrica de 3.0 mL con una incertidumbre de $\pm 0.010 \text{ mL}$ y un matraz volumétrico de 10.0 mL con una incertidumbre asociada de $\pm 0.04 \text{ mL}$; para la masa pesada de romero se toma como incertidumbre la resolución de la balanza analítica: 0.0001 g.

Una vez que se tiene la U_A , se calcula U_B con los datos anteriores y posteriormente U_C , que considera todas las fuentes de incertidumbre asociadas al experimento.